



Fundación JL Castaño
SEQC

SEQC^{ML}
Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2017-2018

APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS TÉCNICAS ACTUALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Ed. Cont. Lab. Clin 37: 26 - 32

MLPA EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS.

Pilar Carrasco Salas.

Unidad de Genética, Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Juan Ramón Jiménez (Huelva).

Inmaculada Martín Mérida.

Servicio de Genética. Instituto de Investigación Sanitaria-Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (Madrid).

1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La técnica de MLPA (de sus siglas en inglés **Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification**, amplificación de sondas tras ligación múltiple) es una variante de la reacción en cadena de la ADN polimerasa múltiple (PCR multiplex, del inglés *polymerase chain reaction*), que permite la amplificación de hasta 40 regiones de ADN. Utiliza sondas de dos oligonucleótidos que reconocen sitios adyacentes en el ADN, y que contienen una secuencia universal que permite la amplificación simultánea por PCR de todas las sondas con sólo una pareja de cebadores. Además, uno de los oligonucleótidos contiene una secuencia de longitud variable (secuencia *stuffer*), que permite la separación de los fragmentos amplificados durante la electroforesis.

La reacción de MLPA se puede dividir en 5 etapas:

- 1) Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas
- 2) Reacción de ligación
- 3) Amplificación
- 4) Separación de los productos de amplificación por electroforesis
- 5) Análisis de los datos

En el primer paso, el ADN se desnaturaliza y se incuba con la mezcla de sondas. Los dos oligonucleótidos de cada sonda reconocen secuencias de ADN contiguas, y sólo cuando ambos se unen perfectamente a estas secuencias, pueden ser ligados por la ligasa y poste-

riormente amplificados (Figura 1). La amplificación por PCR, como ya se ha comentado, se lleva a cabo usando sólo un par de cebadores universales, uno de los cuales está marcado con un fluorocromo. Un aspecto clave en los ensayos de MLPA es que los cebadores no amplifican las secuencias dianas, sino las sondas ligadas. Como sólo las sondas que están ligadas serán amplificadas, la cantidad de producto ligado es una medida del número de secuencias diana que hay en la muestra.

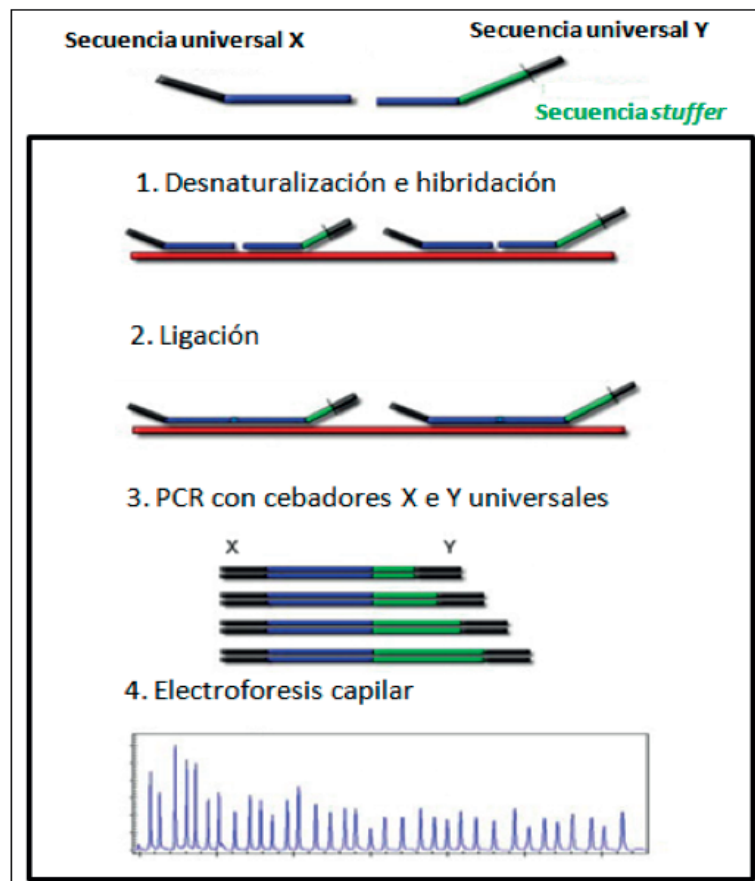


Figura 1: Esquema de la técnica de MLPA. Imagen modificada de www.mlpa.com.

Debido a que uno de los cebadores está marcado con un fluorocromo, los productos de PCR o amplicones que se producen generan un pico fluorescente que permite su detección por electroforesis capilar. La secuencia *stuffer* permite además diferenciarlos en función del tamaño. Tras la electroforesis, se mide el área del pico de PCR de cada producto amplificado.

Para poder analizar los resultados, los ensayos de MLPA siempre deben realizarse con varios ADN controles negativos.

Los kits comerciales que existen en el mercado, contienen además de las sondas específicas para los exones del gen que se quiere estudiar, sondas para otras regiones cromosómicas, que se utilizan como secuencias de referencia en el análisis de los datos, y sondas control

que proporcionan información acerca de la calidad de la reacción. Estas últimas sondas tienen una secuencia *stuffer* pequeña y aparecen al inicio de la electroforesis. Los fragmentos que se producen informan de si ha habido problemas en la desnaturalización de la muestra (se denominan fragmentos D), de si la cantidad de ADN utilizado para la reacción ha sido la correcta (fragmentos Q) y del sexo del paciente, que en muchas ocasiones ayuda a valorar que no ha habido confusión en el análisis de la muestra.

El análisis de los datos requiere varios pasos. En primer lugar, se realiza una normalización intramuestra, dividiendo el área del pico de cada producto amplificado por el total del área de las sondas de referencia utilizadas. En segundo lugar, se realiza una normalización entre las muestras del ensayo, utilizando para ello las áreas obtenidas en los controles negativos utilizados. Hay algunos programas informáticos que ayudan a este análisis complejo de los datos, como el software Coffalyser, que puede descargarse gratuitamente en la página www.mlpa.com.

Un punto crucial en los ensayos de MLPA es la interpretación de los resultados. Las deleciones en homocigosis o hemicigosis (deleciones del cromosoma X en el varón) se ponen en evidencia fácilmente por la ausencia de picos específicos para la secuencia diana, en presencia de una amplificación normal de las sondas de referencia. Sin embargo, las deleciones o duplicaciones en heterocigosis producen una reducción de la señal del 35 al 50 % de la esperada para cada sonda y, en ocasiones, su interpretación puede resultar más complicada y obliga a la repetición del ensayo.

Existen en la actualidad dos variantes de la técnica de MLPA: el MLPA específico de metilación (MS-MLPA) y el MLPA transcriptasa reversa (RT-MLPA). El primero permite detectar alteraciones epigenéticas, es decir, cambios en el patrón de metilación del ADN de genes concretos. En el MS-MLPA, las secuencias dianas donde se unen las sondas, contienen un sitio de restricción para una endonucleasa capaz de reconocer las secuencias no metiladas. Después de la hibridación de las sondas, la muestra se trata con esta endonucleasa que digiere aquellas sondas que se han unido al ADN no metilado, dejando sin digerir las sondas que se han hibridado con el ADN metilado (figura 2). Como consecuencia, sólo estas últimas sondas serán amplificadas por PCR. La comparación del tamaño del pico de las sondas específicas de las regiones metiladas entre la muestra y los controles, proporciona información acerca de los niveles de metilación de las regiones de ADN complementarias a las sondas.

El RT-MLPA se utiliza para cuantificar la cantidad de ARN mensajeros (ARNm) sintetizados por genes de interés seleccionados. La diferencia con respecto al MLPA radica en que se parte de ARN en vez de ADN genómico y que es necesario realizar, antes de llevar a cabo la hibridación de la muestra con las sondas, un paso previo de retrotranscripción para convertir el ARN de partida en ADN complementario (Figura 2)

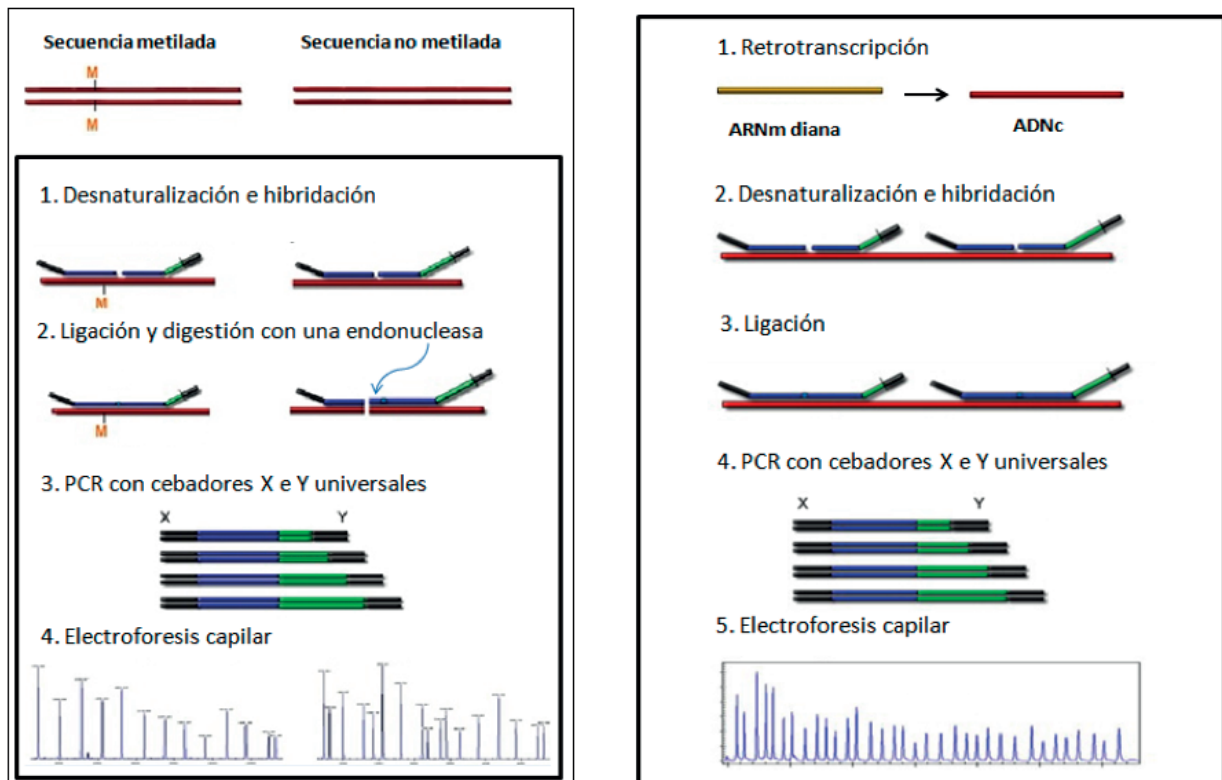


Figura 2: Esquema de la técnica de MS-MLPA (izquierda) y de RT-MLPA (derecha). Imagen modificada de www.mlpa.com.

2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

La técnica MLPA se utiliza para: 1) detectar variaciones en el número de copias, es decir, deleciones o duplicaciones de regiones genómicas determinadas, 2) Identificar alteraciones epigenéticas y 3) Cuantificar de manera parcial el transcriptoma. Existen kits comerciales ya preparados que están diseñados para analizar genes concretos y que consisten en una colección de sondas específicas.

Se pueden agrupar en tres los ámbitos de aplicación del MLPA y sus variantes:

1. Diagnóstico de enfermedades hereditarias, incluyendo el cáncer hereditario. Aunque la mayoría de las enfermedades hereditarias se producen por alteraciones en la secuencia de ADN (mutaciones puntuales), las grandes deleciones y duplicaciones representan una proporción relevante (alrededor del 5 %) de las mutaciones causantes de enfermedad, siendo en algunos casos la causa más frecuente, como es el caso de la distrofia muscular de Duchenne (OMIM #31020) o la atrofia muscular espinal (OMIM #253300).

En otros casos, se utiliza el MS-MLPA para el diagnóstico de enfermedades hereditarias. Es el caso del síndrome de Prader Willi (SPW; OMIM #176270) y del síndrome de Angelman (SA; OMIM #105830), que se producen por alteraciones en genes con *imprinting* en la región cromosómica 15q11-q13. Los genes improntados son aquellos que se expresan exclusiva o preferencialmente en sólo uno de los alelos del gen debido a que el otro alelo

no se transcribe. Esto se produce por la adición de grupos metilos a los residuos de citosina de los dinucleótidos formados por citosina y guanina (CpGs). Los grupos metilos crean una configuración local de la cromatina que hace los genes inaccesibles y por ello, transcripcionalmente inactivos. En general, un alto nivel de metilación de los genes se relaciona con un bajo nivel transcripcional, aunque no siempre es así. La mayoría de los genes que se encuentran en la región 15q11-q13 están no metilados en el alelo paterno, mientras que en el alelo materno estos genes están metilados y por tanto, no se expresan. El SA se produce por la pérdida del alelo metilado en la región cromosómica 15q11-q13. Por tanto, cuando las muestras de estos pacientes se analizan por MS-MLPA, no se observa señal para las sondas específicas de metilación del kit. En las muestras de pacientes con SPW la interpretación del MS-MLPA es un poco más compleja y depende del tipo de alteración que da lugar a la enfermedad (disomía uniparental, delección o defecto de *imprinting*).

2. Análisis de delecciones/duplicaciones somáticas en genes implicados en la progresión de la enfermedad o en la respuesta al tratamiento. Una ventaja importante del MLPA es que permite trabajar con tejidos en parafina.

El estudio del perfil genómico por MLPA se utiliza en muchos tipos de tumores: neoplasia endocrina múltiple 1, neuroblastoma, cáncer de pulmón, carcinoma de laringe y faringe, melanoma, cáncer gástrico o carcinoma renal, entre otros. Por ejemplo, en gliomas, el MLPA permite identificar marcadores de alto grado de malignidad como las delecciones/duplicaciones en los genes *EGFR* (OMIM *131550), *CDKN2A* (OMIM *600160) y *PTEN* (OMIM *601728).

En otros casos, el MLPA se utiliza para detectar delecciones/duplicaciones somáticas relacionadas con la respuesta al tratamiento de determinadas neoplasias. Es el caso de la determinación del estado del receptor tirosin-quinasa HER-2/neu en el cáncer de mama, el cual representa una diana terapéutica y cuyo estudio molecular debe realizarse para seleccionar aquellos tumores que sobreexpresan el gen y que serán susceptibles de recibir inmunoterapia o quimioterapia basada en taxanos.

3. Expresión génica. En la actualidad, hay un interés creciente por monitorizar e interpretar los eventos transcripcionales que se producen en los procesos biológicos. Los cambios en la expresión génica son importantes en el desarrollo y la diferenciación celular y juegan un papel decisivo en muchos procesos patológicos.

Hay kits desarrollados para detectar la cantidad de ARNm de varios genes relacionados con la inflamación y la apoptosis. Estos kits permiten cuantificar la expresión de hasta 45 ARNm en el mismo tubo de reacción.

3. LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

El MLPA presenta relativa simplicidad, bajo coste y posibilidad de realizar la técnica en cualquier laboratorio ya que sólo se necesita un termociclador y un secuenciador capilar. Sin embargo, hay que tener en cuenta las limitaciones que presenta:

- Los resultados del MLPA dependen de la calidad de la muestra que se analiza. La calidad de la muestra puede verse afectada por: el tipo de muestra usada para extraer ADN (como sangre o saliva), el método de extracción del ADN, la solución en la cual el ADN se almacena, el grado de degradación (si lo hay) y la presencia de contaminantes (proteínas, ARN, sales, etanol, ...). Esta limitación se puede reducir si el análisis se realiza con muestras procedentes del mismo tejido y extraídas con el mismo método.
- Los resultados obtenidos pueden verse afectados por cambios en la secuencia de ADN donde se une la sonda del MLPA, debidos a la presencia de una mutación o un polimorfismo. Incluso cuando no se localiza exactamente en el sitio de ligación de la sonda, pueden provocar una disminución de la correcta hibridación de la misma dando lugar a una falsa delección. Por ello, a la hora de interpretar los resultados el hecho de que aparezcan varias sondas seguidas delecionadas apoya a que sea una delección real. Sin embargo, hay que tener cuidado si se detecta delección de una sola sonda.
- Una desnaturalización inadecuada de la muestra de ADN puede dar lugar a falsas delecciones. La presencia de sales en la muestra de ADN provoca que las zonas ricas en GC no se desnaturalicen correctamente impidiendo la unión de las sondas del MLPA. Por ello, se deben comprobar los fragmentos D, que como hemos comentado, detectan los problemas de desnaturalización de la muestra.
- No detecta delecciones/duplicaciones que caigan fuera de donde se encuentran diseñadas las sondas del MLPA.
- Imposibilidad de detectar reordenamientos genómicos equilibrados, como translocaciones o inversiones, ya que el MLPA compara la cantidad de ADN de una muestra problema frente a un control y un reordenamiento equilibrado produce un cambio en el orden de la secuencia del ADN, pero no en la cantidad.
- Dificultad para detectar mosaicismos, debido a que el resultado de las células normales puede enmascarar el resultado de las células anormales, ya que el resultado del MLPA procede de la media de todas las células de las cuales se haya extraído el ADN. Éste mismo hecho ocurre en el análisis de muestras tumorales.

Cualquier delección o duplicación detectada por MLPA debería siempre confirmarse por otros métodos alternativos como PCR cuantitativa o PCR larga, especialmente si se trata de una delección de un único exón. La secuenciación también se puede usar para estudiar, en las delecciones de un solo exón, si existe una mutación o un polimorfismo en la secuencia donde las sondas del MLPA se unen.

Además, ante cualquier caso positivo y en caso de no poder confirmarse por otros métodos, se recomienda repetir el experimento para comprobar la reproducibilidad. Se aconseja disminuir la concentración de ADN de la muestra para descartar que se trate de un falso positivo debido a contaminantes de la muestra, y que se utilicen distintas muestras de ADN como controles de referencia.

BIBLIOGRAFÍA

Armour JA, Barton DE, Cockburn DJ, Taylor GR. The detection of large deletions or duplications in genomic DNA. *Hum Mutat* 2002;20:325-337.

Ayuso C, Millan JM. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Med* 2010;2:34.

Eldering E, Spek CA, Abersson HL, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e153.

Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijzen S, Wesseling P. Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *J Mol Diagn* 2006;8:433-443.

Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* 2008;29:4627-4636.

Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem* 2006;52:1276-1283.

Purnomosari D, Aryandono T, Setiaji K, Nugraha SB, Pals G, van Diest PJ. Comparison of multiplex ligation dependent probe amplification to immunohistochemistry for assessing HER-2/neu amplification in invasive breast cancer. *Biotech Histochem* 2006;81:79-85.

Rose AM, Bhattacharya SS. Variant haploinsufficiency and phenotypic non-penetrance in PRPF31-associated retinitis pigmentosa. *Clin Genet* 2016;90:118-126.

Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci* 2012;13:3245-3276.

Willis AS, van den Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2012;32:315-320.

COMISIÓN DE GENÉTICA

Presidenta: Pilar Carrasco Salas.

Miembros: Concepción Alonso Cerezo, Ana Cuesta Peredo, Orland Diez Gibert, Begoña Ezquieta Zubizaray, Hada Macher Manzano, Jesús Molano Mateos, Josep Oriola Ambròs, Raquel Rodríguez López, Atocha Romero Alfonso, Ana M^a Sánchez de Abajo, María Santamaría González (*coordinadora*), Cristina Torreira Banzas.

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi (*Residente*), R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, A. Merino, A. Moreno, A. Peña, N. Rico, M. Rodríguez (*Presidente*), MC. Villà.

ISBN 978-84-697-4013-2 – Enero 2018 (recibido para publicación Junio 2017).