

### BASI SCIENTIFICHE

La metilazione dei residui di citosina nel contesto delle "CpG islands" ha un importante effetto di regolazione sull'espressione genica. In particolare, l'ipermetilazione delle "CpG islands" nella regione promotore di un gene reprime la trascrizione del gene stesso. In molti tumori è stata dimostrata l'ipermetilazione del promotore di geni oncosoppressori, quali p16, p15, E-caderina e di altri geni quali "DAP-kinase", gene inibitore della progressione metastatica, O-6-metilguanina DNA metiltransferasi (MGMT), gene coinvolto nel riparo del DNA, Glutazione-S-transferasi (GSPT1) etc.

Il gene MGMT (O-6-Metilguanina-DNA Metiltransferasi) presente sul cromosoma 10q26, codifica per una proteina che ripara i danni del DNA rimuovendo i gruppi alchili dalla posizione O-6 della guanina, un importante sito di alchilazione del DNA.

### SIGNIFICATO CLINICO

La chemioterapia provoca l'alchilazione in questa posizione inducendo tossicità ed apoptosi. Pertanto, livelli elevati della proteina coinvolta nel riparo del DNA, ossia MGMT, possono contrastare l'effetto terapeutico degli agenti alchilanti e quindi portare al fallimento del trattamento.

L'analisi dello stato di ipermetilazione è effettuata su DNA genomico.

È noto che il plasma ed il siero di pazienti portatori di neoplasie maligne contengono una quantità di DNA genomico circolante fino a 4 volte maggiore rispetto ai soggetti di controllo.

La valutazione dello stato di ipermetilazione di un gene costituisce potenzialmente un sensibile marker molecolare per definire lo stato di rischio, ottenere una precoce diagnosi e tracciare una prognosi nelle malattie neoplastiche. L'ipermetilazione del promotore MGMT, che determina il silenziamento del gene, è presente in circa il 40% dei glioblastomi multiformi ed è stato identificato come il meccanismo principale per ridurre l'espressione di MGMT e quindi diminuire la sua attività di riparo del danno al DNA.

### INFORMAZIONI E PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO

Il kit permette l'identificazione dello stato di metilazione del promotore del gene O-6-metilguanina DNA metiltransferasi (MGMT).

La metodica prevede l'estrazione del DNA genomico da siero, sangue intero o tessuto, il trattamento del DNA con sodio bisolfito in modo da trasformare i residui di citosina non-metilati in uracile, l'amplificazione mediante PCR con oligonucleotidi specifici per le sequenze metilate e non-metilate (MSP: methylation specific PCR) utilizzando una mix PCR contenente SYBR-Green. Quest'ultimo è un colorante in grado di legare il DNA a doppio filamento, emettendo un quantitativo di fluorescenza (lettura a 520 nm) proporzionale al quantitativo di DNA legato. La risoluzione è effettuabile utilizzando una strumentazione Real-Time PCR.

### CARATTERISTICHE TECNICHE

- **Principio del metodo:** A) Estrazione del DNA genomico  
B) Modificazione con sodio bisolfito  
C) Amplificazione e Rivelazione con un sistema di Real-Time PCR.
- **Applicabilità:** su DNA genomico estratto e purificato da campioni di siero/plasma o tessuto fresco/incluso in paraffina.
- **Numero di test:** 25
- **Stabilità:** fino alla data di scadenza indicata sul prodotto.
- **Specificità Analitica:** Assenza di appaiamenti aspecifici di oligonucleotidi e sonde; Assenza di cross-reattività.
- **Sensibilità Analitica:** **LOD:**  $\geq 2,5$  ng di DNA modificato con sodio bisolfito.  
**LOB:** 0% NCN.
- **Riproducibilità:** 99,9%.
- **Specificità e Sensibilità Diagnostica:** 100%/98%



UNI EN ISO 9001  
UNI CEI EN ISO 13485

Il kit IVD è marcato CE.  
Conforme alla direttiva 98/79.