

# Neurofibromatóza I

von Recklinghausenova nemoc

*Zpracovali: Zuzana Melišová  
Peter Minárik  
Kateřina Matoušková  
Martin Šeřík*

- je dědičné autozomálně dominantní onemocnění (1:3000) vycházející z buněk odvozených z neurální lišty
- 

Příčinou je *vrozená genetická mutace v genu NF1 (17q11.2)*, který se skládá ze 60 exonů. Jde o *tumor-supresorový gen*, jehož produkt (**neurofibromin**) je součástí intracelulární signální kaskády spojené s RAS-kinasou.

Vlivem této mutace dochází ke zvýšenému množení podpůrných buněk CNS a PNS (Schwannovy bb. aj.) s výraznou predispozicí k vzniku benigních i maligních nádorů.

## Klinické projevy:

- Tzv. „*café-au-lait spots*“ - skvrny barvy „bílá káva“, v 90 % se objeví do 5 let věku a ve větší míře i pihy v kožních záhybech
- **Neurofibromy** - mnohočetné tumorózní uzlíky, které vznikají z obalů nervových vláken. Člověk je typicky pozoruje jako podkožní tužší boule. Svým růstem mohou neurofibromy utlačit blízké nervy, cévy nebo jiné důležité tkáně. (kutánní, subkutánní a plexiformní; hlavně v axilách a třísech)

---

- **Lischovy uzlíky** - hamartomy duhovky
- Zvýšené riziko vzniku různých **nádorových onemocnění**: *gliomy CNS* (gliomy optiku) i nebezpečný *multiformní glioblastom*, neurofibrosarkom, rhabdomyosarkom, *feochromocytom*, leukemie apod.
- Postižení **muskuloskeletálního systému** - subperiostální neurofibromy – působící hypertrofii kosti, její prořidnutí a patologické fraktury, skolióza, vrozená dysplázie tibie
- Postižení **intelektu** (mentální retardace), epilepsie nebo stenózy a. renalis
- Častější výskyt **vysokého krevního tlaku** a další..



# Recklinghausenova nemoc, neurofibromatóza

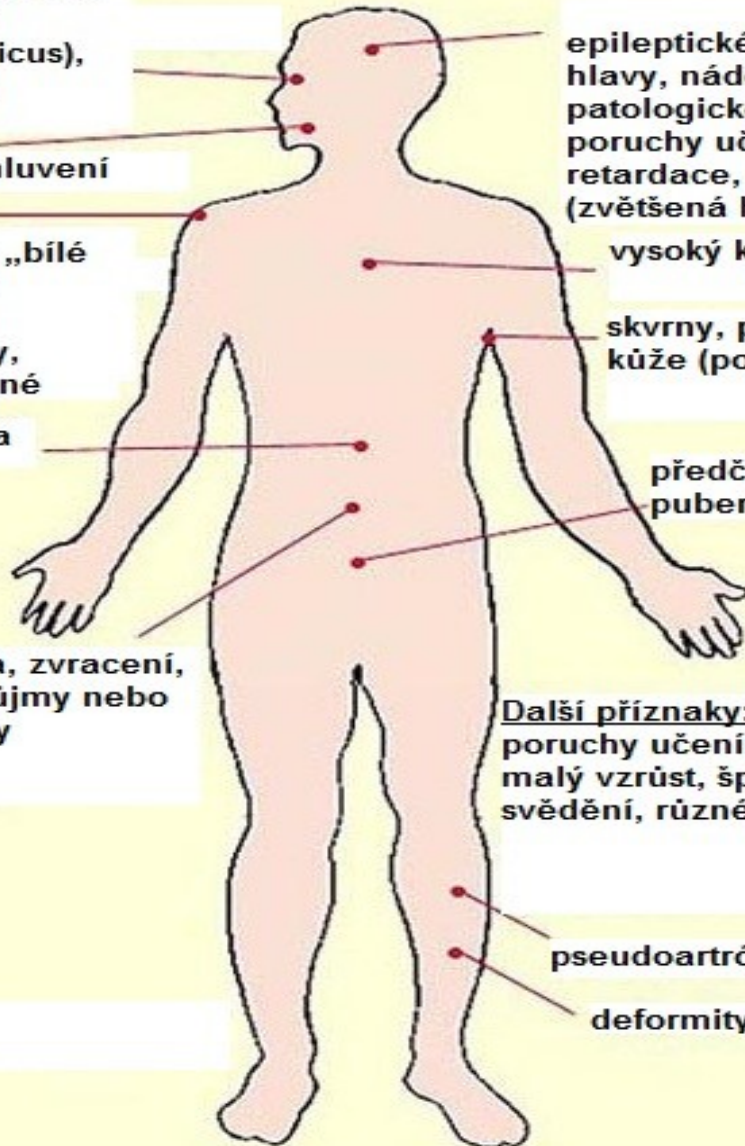
poruchy zraku nebo  
slepota (kvůli  
nádoru n. opticus),  
Lischovy uzly  
duhovky

poruchy mluvení

skvrny barvy „bílé  
kávy“, četné  
nádory -  
neurofibromy,  
kdekoliv, různé

skolióza

bolesti břicha, zvracení,  
chronické průjmy nebo  
naopak zácpy



epileptické záchvaty, bolesti  
hlavy, nádory mozku,  
patologické cévy mozku,  
poruchy učení, mentální  
retardace, makrocefalie  
(zvětšená hlava)

vysoký krevní tlak

skvrny, pihy v místě styku  
kůže (pod prsy, podpaží ad.)

předčasná nebo opožděná  
puberta

Další příznaky:  
poruchy učení, mluvení, chůze,  
malý vzrůst, špatné školní výsledky,  
svědění, různé další potíže, nádory.

pseudoartróza, patol. klouby

deformity kostí

## Mozaiková forma mutace

- segmentální projevy
- asymetrie
- solitární výskyt v rodině

## Mikrodeleční a bodové mutace

- závažnější projevy





Lischovy uzlíky (hamartomy duhovky)



Faciální dysmorfie

Četné neurofibromy



Časné známky neurofibromatózy typu I:  
drobné neurofibromy a skvrny barvy bílé kávy (*café-au-lait*)





# *Problémy molekulární diagnostiky*

## -obtížné klinické stanovení diagnózy NF1

-*vysoká mutační rychlost* genu NF1 : přibližně 50% případů reprezentuje *de novo* mutace

-*velikost genu*

-*absence hot spot oblastí* → nutnost vyhledávání mutací v celém genu

-nejasná korelace mezi *typem mutace a fenotypem choroby*

-známa *funkce* pouze u centrální domény neurofibrominu

-rozdílné *klinické manifestace* dokonce i mezi členy jedné rodiny

# Strategie molekulární diagnostiky

---

## 1. Nepřímá DNA analýza genu NF1

- určuje se *přenos patologické alely* genu „označené“ intragenovými polymorfními místy v rodině, nemůže potvrdit ani vyvrátit klinickou diagnózu (princip genetické vazby)
- používá se v rodinách se dvěma a více členy s neurofibromatózou typu 1 potvrzenou na základě klinických kritérií, u kterých nebyla nalezena konkrétní mutace genu NF1
- má význam pro určení rizika členů rodiny, u kterých se dosud neprojevíly klinické příznaky a pro prenatální diagnostiku



# Strategie molekulární diagnostiky

---

## 2. Přímá DNA analýza genu NF1

- založena na **skrínovacích metodách SSCP** (jednořetězcový konformační polymorfismus) a **DGGE** (denaturační gradientová gelová elektroforéza)
- Principem je odlišit různou **elektroforetické mobilitu** normálních a mutantních DNA **jednořetězců** v nedenaturujícím gelu (SSCP) nebo DNA **dvouřetězců** v denaturačním polyakrylamidovém gelu (DGGE)
- dokáže odhalit odpovědnou **mutaci**, a tu pak sledovat v předchozích i následných generacích rodiny, dokonce i v populacích



# Strategie molekulární diagnostiky

---

## 3. RNA diagnostika genu NF1

- *detekce mutací v cDNA*, které ovlivňují sestřih
- umožňuje skrínovat celou kódující oblast genu

Izolace RNA z krve nebo tkáně, přepis RNA zpětnou transkriptázou do cDNA, amplifikace vnitřní kódující oblasti cDNA s 10-ti páry specifických primerů, které pak pokrývají celou kódující oblast genu NF1 → mutační analýza segmentů P1-P10 a sekvenace vzorků s odlišnou elektrolytickou mobilitou → určení typu a polohy mutace

+ / -

---

+ detekuje i sestřihové mutace

+ manipulace pouze s 10 -20 fragmenty cDNA (každý fragment obsahuje přepis několika exonů)

- práce s RNA je náročnější (RNA je náchylnější k degradaci)

- obtížnější manipulace s delšími fragmenty cDNA

- nejasný původ některých sestřihových změn



# Strategie molekulární diagnostiky

---

## 4. Technika MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)

- je nová metoda molekulární biologie, využívá multiplexové PCR k vyšetření až 45 specifických sekvencí
- detekuje **změny** jako jsou **delece, amplifikace**, a také **známé bodové mutace a metylace genů**
- testování velkého počtu DNA vzorků, velmi citlivá metoda, stačí malá dávka DNA různého původu

# MLPA

---

- Principem této metody je navázání oligonukleotidových sond na cílovou sekvenci DNA na základě jejich **komplementarity** (každá sonda se skládá ze dvou oligonukleotidů). Po **hybridizaci** na cílové místo jsou oligonukleotidy spojeny **ligací** - pouze spojené sondy jsou po denaturaci amplifikovány pomocí klasické **PCR** reakce za použití jednotného páru primerů. Namnožené sondy jsou rozděleny **kapilární elektroforézou** na základě jejich různé délky. Nakonec jsou analyzovány.



# Strategie molekulární diagnostiky

---

## 5. NGS (next-generation sequencing)

- nové metody - zefektivnění, zjednodušení, urychlení či zpřesnění DNA sekvenování, aby bylo schopné přečíst co nejrychleji velké genomy
- patří sem např.: **454 sekvenování** - paralelně probíhá mnoho sekvenovacích procesů  
**SMRT** (single molecule real-time) – v reálném čase probíhající replikace DNA, barvení fluorescenčně  
**technologie nanopórů** – v nich umístěny elektrody

# Terapie

---

- kauzální terapie neexistuje
- vhodná je **dispenzarizace pacientů** s prokázanou diagnózou neurofibromatózy, monitoring každý rok ( vyšetření zraku, kůže, kostí, vývoje, hledání nádorových změn pomocí UZ, CT nebo MRI )
- **chirurgické zákroky** indikovány při útlaku nervu / obstrukci u GIT formy, případně z kosmetického hlediska
- **neurochirurgické zákroky** při postižení CNS; možné využití stereotaktické neurochirurgie (Leksellův gama nůž)
- **Genová terapie** - blokování *enzymů* zapojených do famesylace ras nebo *dalších cílů* aktivovaných proteinem ras pro amplifikaci mitogenního signálu



**Děkujeme za pozornost**



# Zdroje:

---

- <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Neurofibromat%C3%B3za>
- <http://www.stefajir.cz/?q=neurofibromatoza>
- <http://www.priznaky-projevy.cz/geneticke-nemoci/recklinghausenova-choroba-neurofibromatoza-priznaky-projevy-symptomy-obrazek-fotografie>
- <http://www.molekulara.cz/co-vysetrujeme/neurofibromatoza-typu-1/>
- <http://www.slideserve.com/jennifer-rodriquez/neurofibromat-za-typu-1-nf1>
- <http://www.cba.muni.cz/cytogenlab/index.php?pg=metody--mlpa>