

Masarykova univerzita
Lékařská fakulta

MOLEKULÁRNĚ - BIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA NEUROFIBROMATÓZY TYPU 1

Bakalářská práce
v oboru zdravotní laborant

Vedoucí bakalářské práce:
Mgr. Silvie Dudová

Autor:
Eva Neubauerová

Brno, duben 2014

Jméno a příjmení autora: Eva Neubauerová

Název bakalářské práce: Molekulárně – biologická diagnostika neurofibromatózy typu 1

Pracoviště: OLG FN Brno

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Silvie Dudová

Rok obhajoby bakalářské práce: 2014

Souhrn

Bakalářská práce „Molekulárně biologická diagnostika neurofibromatózy typu 1“ shrnuje současné poznatky o onemocnění, příznacích a diagnostice NF1. Teoretická část pojednává o onemocnění NF1, diagnostice a současné léčbě. V části „Diagnostika“ jsou popsány metody využívané k detekci NF1. V praktické části je popsáno vyšetření 7 pacientů, kteří byli vyšetřeni pro podezření na NF1 pomocí metody MLPA.

Klíčová slova: neurofibromatóza typu 1, neurofibromin, CAL, diagnostika, MLPA

Summary

The bachelor thesis „Neurofibromatosis type 1 diagnostics by methods of molecular biology“ summarizes present knowledge about disease, symptoms and diagnostics of NF1. The theoretical part focuses on the disease NF1, diagnostics and current therapy. In the part of „Diagnostics“ methods for detection NF1 are described. The practical part focuses on seven patients who were analysed for NF1 by MLPA method.

Keywords: neurofibromatosis type 1, neurofibromin, CAL, diagnostics, MLPA

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Silvie Dudové a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

V Brně dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Silvii Dudové za vedení, pomoc, cenné rady a dohled při psaní teoretické i praktické části mé práce.

POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY

CAL	cafe au-lait skvrny
CGH	komparativní genomová hybridizace
CNS	centrální nervový systém
ddNTP	dideoxynukleotidy
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
DGS	přímé sekvenování
DHPLC	denaturační vysokotlaková kapalinová chromatografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GAPs	GTPasa aktivační protein
HA	heteroduplexní analýza
HRM	vysokorozlišovací analýza křivek tání
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
MPNST	maligní nádory pochev periferních nervů
NF1	neurofibromatóza typu 1
NGS	sekvenování nové generace
PTT	detekce zkráceného proteinu
qPCR	kvantitativní PCR
RT-PCR	real time PCR
SSCP	polymorfismus konformace jednořetězové DNA
TGGE	gelová elektroforéza s teplotním gradientem

OBSAH

1. ÚVOD.....	- 8 -
2. NEUROFIBROMATÓZA TYPU 1	- 9 -
2.1. Historie NF1.....	- 9 -
2.2. Gen NF1	- 9 -
2.2.1. Dědičnost.....	- 10 -
2.2.2. Mutace genu NF1	- 10 -
2.3. Neurofibromin.....	- 11 -
2.4. Stanovení diagnózy	- 12 -
2.5. Klinické projevy	- 12 -
2.5.1. Nenádorové projevy NF1	- 12 -
2.5.1.1. Café-au-lait skvrny	- 13 -
2.5.1.2. Lischovy noduly	- 14 -
2.5.1.3. Autoimunitní onemocnění	- 14 -
2.5.2. Nádorové projevy NF1	- 15 -
2.5.2.1. Nádory periferního nervstva.....	- 15 -
2.5.2.1.1. Neurofibromy	- 15 -
2.5.2.1.2. MPSNT (maligní nádory pochev periferních nervů).....	- 16 -
2.5.2.2. Nádory centrálního nervového systému	- 16 -
2.6. Léčba.....	- 17 -
3. DIAGNOSTIKA	- 18 -
3.1. SSCP	- 20 -
3.2. DGGE	- 20 -
3.3. TGGE.....	- 21 -
3.4. FISH.....	- 21 -
3.5. Array CGH.....	- 21 -
3.6. DHPLC	- 22 -
3.7. PTT	- 23 -
3.8. Southern blotting.....	- 23 -
3.9. Heteroduplexní analýza	- 24 -
3.10. HRM	- 24 -

3.11. Přímá sekvenace	- 25 -
3.12. Sekvenování nové generace	- 27 -
3.13. qPCR.....	- 27 -
3.14. MLPA	- 28 -
4. PRAKTICKÁ ČÁST	- 32 -
4.1. Chemikálie	- 33 -
4.2. Přístrojové vybavení	- 33 -
4.3. Materiál	- 33 -
4.4. Program analýzy	- 34 -
4.5. Postup.....	- 34 -
4.6. Vyhodnocení	- 35 -
5. DISKUZE A ZÁVĚR	- 39 -
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 42 -
7. PŘÍLOHY	- 46 -

1. ÚVOD

Pokrok v molekulární biologii vedl k mnoha významným objevům. Mezi jedny z nich lze zařadit i objevení velké škály mutací genu NF1, a to díky vynálezům nových detekčních technik. Od roku 1990, kdy byl na 17. chromozomu nalezen gen NF1 (17q11.2), do prosince 2013 bylo objeveno 1237 mutací. Vzhledem k vysoké frekvenci vzniku spontánních mutací to jistě není konečné číslo.

Neurofibromatóza typu 1 (NF1) je autosomálně dominantní onemocnění. První zmínky pochází z konce 19. století. V populaci se vyskytuje s četností 1:3000 – 4000. Onemocnění se projevuje skvrnami barvy bílé kávy, harmatomy duhovky, mnohočetnými neurofibromy, gliomy optického nervu a/nebo mnohočetnými axilárními či inguinálními pihami. Onemocnění vzniká v důsledku mutace genu NF1. Gen NF1 obsahuje 58 exonů. Jedná se o neobvykle velký gen. Má jednu z nejvyšších frekvencí vzniku spontánních mutací, což komplikuje diagnostiku NF1. Gen NF1 kóduje cytoplazmatický protein neurofibromin, který je považován, na základě ztráty funkce, za tumorsupresorový gen.

Diagnostika se provádí na základě kritérií dle National Institute of Health Consensus Development Conference z roku 1988. Problémy molekulární diagnostiky jsou ve vysoké mutační rychlosti genu, kdy jsou až u 50% hlášeny mutace *de novo*, ve velikosti genu, absenci hot spot oblastí (což vede k detekci mutací v celém genu), rozdílném fenotypu dokonce i u členů rodiny a nejasném vztahu mezi genotypem a fenotypem onemocnění.

Cílem mé práce je seznámení s onemocněním NF1 a zhodnocení přínosu jednotlivých molekulárně biologických metod pro stanovení NF1 s přihlédnutím k metodě MLPA.

V následující části své bakalářské práce popíšu onemocnění a příznaky NF1, gen NF1 a protein neurofibromin. V další části popíšu jednotlivé metody, které se dříve pro diagnostiku mutací užívaly či se stále ještě využívají. A v poslední části popíšu výsledky analýzy 7 pacientů, kteří byli vyšetřeni pro podezření na NF1.

2. NEUROFIBROMATÓZA TYPU 1

Neurofibromatóza typu 1 (NF1), nazývaná též Recklinghausenova choroba, je známa od konce 19. století. V 90. letech 20. století byla neurofibromatóza rozdělena, díky objevení genu na 17. a 22. chromozomu, na dva typy (typ jedna a typ dva). Rozdíl je v již zmíněném umístění genu, v klinickém obraze a ve věku při manifestaci.

Konkrétně roku 1990 byl nalezen na 17. chromozomu (17q11.2) gen NF1, který má 58 exonů a 350 kb genomické DNA. Jeho změny jsou zodpovědné za vznik NF1.

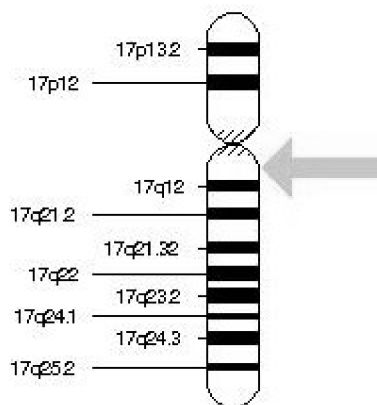
Onemocnění se nejčastěji projevuje skvrnami barvy bílé kávy (café-au-lait), Lischovými noduly (hamatomy duhovky) a mnohočetnými neurofibromy (1,2).

2.1. Historie NF1

První zmínka o NF1 pochází z 16. století. První průzkum pravděpodobného onemocnění proběhl roku 1849 pod vedením Roberta W. Smitha, který byl dublinský profesor chirurgie, prohlašující, že původ nádoru pochází z pojivové tkáně obklopující malé nervy. Roku 1882 publikoval Friedrich Daniel von Recklinghausen mezní článek o vztahu mezi mnohočetnými fibromy kůže a mnohočetnými neuromy. Díky tomuto článku začala být neurofibromatóza uznávaná jako samostatná porucha a na základě objevitele je nazývaná Recklinghausenovou chorobou. Recklinghausen byl prvním, kdo si uvědomil, že charakteristické nádory pocházejí z nervové tkáně. Roku 1956 Crowe, Schull a Neel publikovali práci podrobně popisující četné projevy této poruchy. Roku 1982 Riccardi rozdělil neurofibromatózu do 8 kategorií, které nebyly všeobecně přijaty, avšak některé přetrvávají. NF1 a NF2 zůstaly klasifikovány podle původního rozdělení (1,3).

2.2. Gen NF1

Gen NF1 se nachází na 17. chromozomu (17q11.2). Má 58 exonů a jeho rozsah sekvencí je přibližně 335 kb. mRNA má mezi 11-13 kb. NF1 je neobvykle velký gen a v lidském genomu má nejvyšší frekvenci spontánní mutace (1 z 10^4 zárodečných buněk). Gen NF1 je na základě ztráty funkce neurofibrominu a somatické mutace NF1 považován za tumor supresorový gen. (1,4)



Obrázek 1 Lokalizace NF1 na chromozomu (5)

2.2.1. Dědičnost

Neurofibromatóza typu 1 je autosomálně dominantní onemocnění, které se vyskytuje v populaci s četností 1: 3 000 – 4 000. Onemocnění se začíná projevovat již v raném dětství. Vznik zděděné a spontánní mutace má téměř stejnou pravděpodobnost. Penetrance se blíží 100 %. Expresivita je vysoce variabilní a to i mezi členy rodiny se stejnou mutací. Je důležité vědět, že jedinec s mírnými fenotypovými projevy může mít potomka s těžkými projevy a naopak (1,3,6).

2.2.2. Mutace genu NF1

Neurofibromatóza typu 1 je způsobená mutacemi v genu NF1 (17q11.2). Mutace může vést ke ztrátě funkce, což se projeví v následném vývoji různých nádorů a abnormalit. Komplikací v analýze mutace genu NF1 je jeho velikost, málo hot spot oblastí a časté mutace *de novo*.

I když je potvrzení mutace užitečné pro diagnostiku, nevypovídá o závažnosti onemocnění. Výjimkou jsou úplná ztráta genu a delece v exonu 17 (1).

U 5-10% pacientů s neurofibromatózou typu 1 se objevuje delece části genu. Kolem 5-10 % jsou mikrolece zahrnující celý lokus NF1 a sousedící geny, což odpovídá ztrátě o velikosti zhruba 1,2-1,4 Mb. Jsou popsány tři typy mikrolece, typ 1 (1,4 Mb), typ 2 (1,2 Mb) a atypický druh mikrolece. Rozsáhlé delece se projevují závažnými komplikacemi, a to obličejovou dysmorfii, poruchou učení a vyšším rizikem vzniku MPNST (maligní nádory pochev periferních nervů). Více než 90 % případů je postiženo intragenovou mutací, u které nebyly objasněny fenotypové projevy. Mutace v čtecím rámci exonu 17 (del AAT), je

spojována s absencí kožních neurofibromů. Tato mutace nastává přibližně u 1-2 % postižených. Velmi vzácně se objevují chromozomové translokace či inverze. (1,4,7–12).

K roku 2011 bylo odhaleno na 728 mutací zahrnující substituce bází, velké delece, inserce, nonsense a missense mutace a posunové mutace (10).

K poukázání na rychlost nárůstu objevených mutací přikládám tabulku se současnými detekovanými mutacemi, kterých je k prosinci roku 2013 nalezeno 1237 (13).

Typ mutace	Počet mutací
Missense/nonsense	297
Sestřihové	279
Malé delece	335
Malé inserce	159
Malé indely	27
Rozsáhlé delece	121
Rozsáhlé inserce/duplikace	11
Komplexní přestavba	8
Celkový počet	1237

Obrázek 2 Typy mutací u NF1 (13)

2.3. Neurofibromin

Gen NF1 kóduje cytoplazmatický protein neurofibromin o 2818 aminokyselinách. Jeho molekulová hmotnost je 327 kDa. Neurofibromin je exprimován v mnoha buňkách těla, nejvíce v neuronech, Schwanových buňkách a oligodendrocytech (1,4).

Jeden z úseků neurofibrominu (exon 21-27b) má rozsáhlou sekvenční homologii (úsek přibližně 360 aminokyselin) s GTPasa aktivačním proteinem (GAPs). GAPs protein hraje roli v regulaci Ras proteinu, který ovlivňuje proliferaci buněk. Inhibicí Ras proteinů je buňka trvale stimulována, a to vede k jejímu nekontrolovatelnému dělení. Působí tedy jako negativní růstový regulátor (2,4,14).

Declue a kol. a Basu a kol. ověřovali tumor supresorovou aktivitu genu NF1. Zkoumali expresi neurofibrominu v maligních nádorových buněčných liniích. Prokázali snížení či absenci neurofibrominu v buněčných liniích neurofibrosarkomu, které vedly k vysoké aktivitě Ras GTP (15).

2.4. Stanovení diagnózy

Od roku 1988 do současné doby platí určitá kritéria pro posouzení diagnózy NF1. Pokud se u jedince objeví více než dva z následujících příznaků, lze podle National Institute of Health Consensus Development Conference potvrdit NF1:

1. skvrny barvy bílé kávy- u dospělých 6 a víc skvrn o průměru 1,5 cm, u dětí 5 a víc skvrn o průměru 0,5 cm
2. dva a více neurofibromů či jeden plexiformní neurinom
3. mnohočetné axilární/ inguinální pihy
4. dysplázie sfenoidálního křídla, kongenitální ohnutí nebo ztenčení kortikální části dlouhých kostí
5. gliom optického nervu
6. dva a více Lischových nodulů
7. příbuzný 1. stupně s NF1

Nutno podotknout, že skvrny barvy bílé kávy na kůži se vyskytují v počtu jedné a více zhruba u 10 % populace. Obdobně je tomu i u dalších příznaků (2,16).

2.5. Klinické projevy

NF1 má velmi široké klinické projevy. Je zde velká predispozice k tvorbě nádorů, ať už charakteru benigního či maligního. Až u 95 % postižených se objevují skvrny barvy bílé kávy. Jsou to hyperpigmentované skvrny se zaoblenými okraji. U 70 % případů se objevují také axilární a tříselné pihy. Dále jsou popisovány Lischovy uzlíky, neurofibromy nebo postižení muskulárního systému. Nejčastějšími nádory jsou tumory centrálního a periferního nervstva. S NF1 je nově spojována také řada autoimunitních chorob (1,2,8,17).

2.5.1. Nenádorové projevy NF1

Co se týče nenádorových projevů, objevuje se v důsledku abnormálních hodnot růstového hormonu nízký vzrůst, makrocefalie nebo anomálie skeletu, např. skolióza či pseudoartróza (Obr. 3). Častá je u dětí bolest hlavy, a to i bez přítomnosti strukturální léze. Méně než 10% jedinců postihuje lehká mentální retardace (IQ pod 70). Až 60 % dětí postihuje vývojová porucha učení a chování. U 7 % dětí se objevuje epilepsie a je převážně sekundární při expanzivních procesech CNS (2).



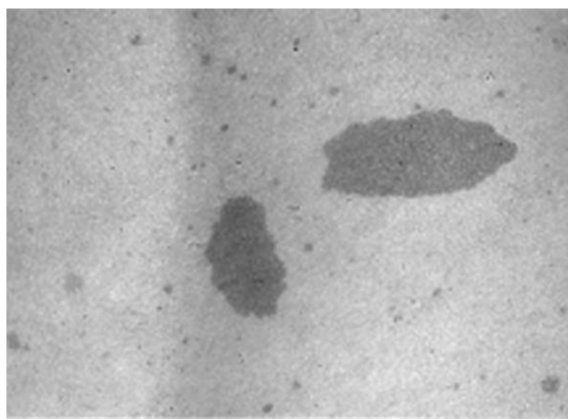
Obrázek 3 Pseudoartróza kosti holenní (18)

2.5.1.1. Café-au-lait skvrny

Časný výskyt skvrn barvy bílé kávy, dále jen CAL, je jedním ze sedmi charakteristických příznaků onemocnění NF1. Skvrny jsou jasně ohraničené a mají homogenní vzhled. Pigment pochází z melanocytů, které mají zvýšenou koncentraci melaninu a obří melanosomy. Barva odpovídá barvě bílé kávy, ale vyskytuje se i v odstínu od světle hnědé až po tmavě hnědou. Ačkoliv se se skvrnami děti mohou narodit, obvykle se objevují od prvních měsíců života zhruba do dvou let. V 99 % případů se CAL vyskytuje během prvního roku života. Méně než 1 % dětí pod 5 let bez diagnózy NF1 má více než dvě CAL (19).

CAL se mohou objevovat v počtu až několika desítek, ale ani počet ani velikost nesvědčí o vážnosti onemocnění, ale za to jsou důležité pro diagnostiku NF1. Přítomnost 6 a více skvrn CAL v průměru 0,5 cm před pubertou a 1,5 cm po pubertě je diagnostickým kritériem pro NF1 (1).

CAL nevykazují sklon k maligní transformaci (19).



Obrázek 4 CAL skvrny (20)

2.5.1.2. Lischovy noduly

Jedná se o melanocytární hamartomy duhovky bez vlivu na zrak. Jsou charakteristické pro onemocnění NF1. Typicky se objevují ve věku 5-10 let. Je důležité odlišit Lischovy noduly od duhovkových névů vyskytujících se v běžné populaci (19).



Obrázek 5 Lischovy noduly (21)

2.5.1.3. Autoimunitní onemocnění

Mezi autoimunitní onemocnění spojené s nemocí NF1 patří například systémový lupus erythematoses, roztroušená skleróza, membranózní glomerulonefritida, IgA nefropatie, juvenilní artritida, autoimunitní hemolytická anémie, autoimunitní tyreoiditida, bulózní pemfigus, vitiligo či smíšené onemocnění pojivové tkáně. Zřídka se vykytuje i diabetes mellitus, který vzniká v důsledku somatostatinomů (17).

2.5.2. Nádorové projevy NF1

U 2-7 % postižených se objevuje maligní transformace. Nejvýznamnější riziko transformace z benigního nádoru na maligní hrozí u transformace benigního plexiformního neurofibromu na MPSNT (maligní nádory pochev periferních nervů), a to u 2-10 %. Častěji se vyskytují maligní nádory pheochromocytomu, endokrinně aktivních nádorů, leukémie (např. chronická juvenilní myeloidní leukémie), Wilmsovy tumory a u dospělých gastrointestinální stromální tumory (2).

Nedávno bylo poukázáno na zvýšené riziko výskytu nádoru prsu u žen. Muži mohou být také ohroženi, avšak vzhledem k vzácnosti výskytu nádoru prsu jsou údaje o riziku omezené (22).

2.5.2.1. Nádory periferního nervstva

Objevují se neurofibromy, benigní nádory z Schwanových buněk, schwannomy, juvenilní xantogranulomy a plexiformní neurofibromy, které však nejsou pro NF1 specifické (2).



Obrázek 6 Plexiformní neurofibrom u ženy s NF1 (20)

2.5.2.1.1. Neurofibromy

Benigní nádory Schwannových buněk vznikají z vazivové tkáně obklopující periferní nervová pouzdra. Jsou tvořeny Schwanovými buňkami, fibroblasty, perineurálními buňkami a žírnými buňkami. NF1 deficientní Schwannovy buňky jsou považovány za primární neoplastické buňky nádoru. V souvislosti s neurofibromy je hlášeno lokalizované svědění, a to v předpokladu aktivace žírných buněk a jejich následná degranulace.

Podle vzhledu a umístění mohou být neurofibromy rozděleny do 4 skupin: ohniskový

nebo difúzní kožní; podkožní; nodulární nebo difúzní plexiformní; páteřní. Umístění a počet neurofibromů je nepředvídatelné a mění se i v rámci členů rodiny.

Ohniskový kožní a kožní neurofibrom se objevují v pozdním dětství či rané adolescenci. Vzácně způsobují bolest a neurologické deficity. Netransformují se do maligních nádorů (19).



Obrázek 7 Pacient s mnohočetnými neurofibromy (20)

2.5.2.1.2. MPSNT (maligní nádory pochev periferních nervů)

Pacientům s onemocněním NF1 hrozí celoživotně 10 % riziko rozvoje MPNST. Asi u 2 % pacientů se onemocnění rozvine. Nejvýznamnější riziko transformace z benigního nádoru na nádor maligní je u transformace benigního plexiformního neurofibromu na MPNST. Onemocnění se vyskytuje především u dospělých jedinců s onemocněním NF1, vzácně u dětí. Onemocnění je obvykle rezistentní k terapii a často metastázuje. Celkově má špatnou prognózu (19).

2.5.2.2. Nádory centrálního nervového systému

Pro CNS je charakteristický gliom nacházející se v oblasti především optické dráhy. Nachází se přibližně u 15-40 % pacientů s NF1 a 10-38 % s optickými gliomy má NF1. Objevují se do 6-10 let. Oboustranné gliomy se vyskytují výhradně u NF1. U pacientů s gliomem chiasmatu se vyskytuje předčasná puberta a to v důsledku utlačování hypothalamu. Gliomy mozkového kmene jsou u NF1 častější než u ostatní populace (2).

2.6. Léčba

Léčba CAL v současnosti nezaznamenala žádnou vysoce efektivní metodu. Odstranění pomocí laseru není považováno za příliš účinné.

Léčba neurofibromů je obtížnější. Spletité neurofibromy se obvykle proplétají v okolních tkáních a kostech. Následná porucha nervů často vede k operaci, která může mít za následek paralýzu. Pacient v takovém případě ztrácí cit či hybnost konkrétního úseku těla.

Léčba gliomu optice není potřebná v případě, že nádor nezpůsobuje komplikace. V opačném případě jsou podávány léky k zmenšení nádoru či se nádor vyoperuje.

Léčba skoliózy se odvíjí od stupně zakřivení páteře. Při vážném zakřivení je obvykle doporučovaná operace, méně závažné případy jsou léčeny rehabilitací či užitím korzetu.

Nádory, které se objeví uvnitř mozku a které narušují normální funkce, jsou, pokud je to možné, operovány. V opačném případě, kdy by hrozilo poškození mozku, jsou předepisovány radioterapie.

Léčba maligních nádorů pochev periferních nervů je prováděna operativně a následně je doplněna o radioterapii a chemoterapii, která minimalizuje návrat rakoviny (23).

3. DIAGNOSTIKA

Detekce mutací a změn genu NF1 je náročná. Mezi problémy molekulární diagnostiky patří velikost genu, velká škála mutací, vysoká mutační rychlosti genu (až 50 % mutací *de novo*), nedostatek hot spot oblastí (nutnost vyhledávat mutace v celém genu) a přítomnosti pseudogenů. K analýze mutací se využívá kombinace několika detekčních technik (24,25).

Diagnostika NF1 se dělí na diagnostiku přímou a nepřímou.

Předpokladem přímé diagnostiky je znalost genu, musíme tedy znát jeho sekvenci. Přímá diagnostika se dělí na scoring, kdy pátráme po přítomnosti určité známé mutace nebo omezeného okruhu mutací a scanning, kdy amplifikujeme jednotlivé exony a pátráme po sekvenční změně. Do přímé diagnostiky u detekce NF1 patří například DGGE/TGGE, SSCP, HD, PTT, sekvenování DNA, RT-PCR (26).

Nepřímá diagnostika se využívá u chorob, kdy není známa konkrétní změna nebo je přímá analýza komplikovaná. Užitím vazebných markerů (polymorfizmů) v rodinných studiích (s výskytem dvou a více členů s klinicky prokázanou diagnózou NF1) odhalí chromozom v asociaci s nemocí v rodině. Nejčastější polymorfnní místa v nepřímé DNA diagnostice jsou dinukleotidové repetice v intronu 27 a 38 a tetranukleotidové repetice v intronu 27b. Heterozygotnost je u těchto polymorfnních míst odhadována na 75 %, takže předpokládá vysokou pravděpodobnost nalezení heterozygotního stavu v testované DNA. Nepřímá diagnostika má u onemocnění NF1 nezastupitelnou pozici, a to díky velikosti genu a nepřítomnosti hot spot oblastí, které jsou komplikací přímé detekce (26).

Například k odhalení minoritních intragenových změn se používal test PTT (test přítomnosti zkráceného proteinu), SSCP (polymorfismus konformace jednořetězcové DNA), DGGE (elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu), TGGE (gelová elektroforéza s teplotním gradientem) a mezi stále se využívající techniky patří DHPLC (denaturační vysokoúčinná kapalinová chromatografie a sekvenování cDNA).

K identifikaci úplné delece genu či rozdílů v intragenových početních kopiích sloužily či ještě slouží metody, jako jsou FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), CGH (komparativní genomová hybridizace), Southern blotting a MLPA.

I přes početné odhalené mutace NF1, je jejich detekce náročná, a tak jsou současné protokoly založené na kombinaci doplňkových technik (25).

K dnešnímu dni se používá z molekulární genetiky vyšetření MLPA, sekvenování, DHPLC, qPCR, NGS (sekvenování nové generace) a z cytogenetických metod to jsou FISH a array CGH.

Cílem mé práce je zhodnotit přínos jednotlivých metod s přihlédnutím k metodě MLPA. V následující části tedy popíšu jednotlivé metody, a to i metody, které se již nevyžívají, a zhodnotím jejich přínos.

3.1. SSCP

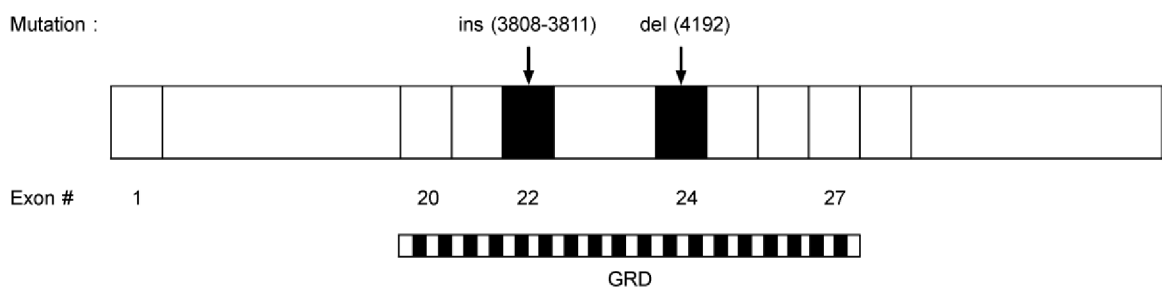
Single strand conformation polymorphism, polymorfismus konformace jednořetězové DNA je elektroforetická metoda založená na pohyblivosti jednovláknové DNA v polyakrylamidovém gelu při nízké teplotě (27).

Již malá změna, jako například záměna jedné báze, může vést k změně konformace jednovláknového fragmentu DNA. Tato změna hraje roli v rozdílné pohyblivosti při elektroforéze (28).

Nejdříve se izoluje DNA např. z leukocytů pacienta a pomocí PCR reakce se amplifikují exony. Produkt PCR je smíchan s denaturačním pufrům a zahřát na 95°C. Po třech minutách se vzorky nanosou na polyakrylamidový gel. Elektroforéza gelu probíhá přes noc při pokojové teplotě. Bandy se vizualizují barvením stříbrem. Gel se suší na papíře ve vakuu a poté se fotografuje (4).

SSCP je vhodná k analýze polymorfismů a bodových změn. Uvádí se 70 % účinnost. (4)

Za pomocí metody SSCP a PCR byly ve studii z roku 2000, kterou bylo testováno 56 korejských pacientů, nalezeny dvě nové mutace. Inzerce v exonu 22 a delece v exonu 24 (Obr. 8) (14).



Obrázek 8 Distribuce mutací nalezených ve studii (14)

3.2. DGGE

Denaturační gradientová gelová elektroforéza na základě odlišné sekvence nukleotidů separuje DNA v polyakrylamidovém gelu. DNA putuje v gelu určitou rychlostí, která odpovídá její hmotnosti, dokud nedorazí do části, kde koncentrace denaturujících látek způsobí její denaturaci z dvouvláknové molekuly DNA na molekuly jednovláknové. Tím způsobí změnu pohyblivosti. Konečná pozice tedy závisí na denaturačním bodu. Vizualizace je možná po obarvení stříbrem nebo ethidiumbromidem (29).

Tato senzitivní metoda se používala k detekci menších mutačních poškození. Tímto způsobem pak byla dosažena až 99 % úspěšnost (30).

Ve studii zkoumající mutace v exonu 29 a 31 bylo zjištěno, že použitím této metody mohou být mutace rozpoznány u 4 ze 70 nepříbuzných pacientů, což činí 5,7 % úspěšnost (30).

3.3. TGGE

Je variantou DGGE, kde je denaturační gradient tvořen teplotním gradientem místo zvyšující se koncentrace urey a formamidu (27).

Použitím TGGE ve screeningu mutací u exonů 4a, 4b a 4c v kohortové studii 196 nepříbuzných pacientů, byly nalezeny mutace pouze v exonu 4b, což bylo potvrzeno ještě následným přímým sekvenováním. Tyto exony si studie vybrala, jelikož v té době nebyly podrobněji studovány. Většina analýz mutací se zabývala centrální částí genu NF1 (30).

3.4. FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace je cytogenetická metoda zaměřená na detekci velkých strukturních změn v genomu. Například změny v počtu chromozomů, rozsáhlé změny ve struktuře (translokace, delecce, inverze). Využívá značených sond, které jsou komplementární k cílové sekvenci. Sondy jsou značené fluorescenčním barvivem, k detekci je využíván fluorescenční mikroskop (28).

U onemocnění NF1 je FISH používána k detekci velkých delecí NF1 (28).

Metodou FISH byli ve studii 67 pacientů vyšetřováni jedinci, kteří vyšli negativní v předchozím vyšetření pomocí metody PTT a heteroduplexní analýzy. Byla zjištěna jedna delecce celého genu a jedna balancovaná translokace t(14;17) (q32;q11,2) (24).

3.5. Array CGH

Metoda využívající hybridizaci DNA izolované ze vzorku s oligonukleotidovými fragmenty uchycenými na čipu. Zkoumaná a referenční DNA se nejprve označí odlišným flouorchromem a poté se nechá hybridizovat s oligonukleotidovými fragmenty na čipu. Následuje promytí nenavázaných sond a vyhodnocení pomocí scanneru. Scanner pomocí laseru nasnímá obraz čipu a pomocí speciálního softwaru dojde k identifikaci každého místa na čipu. Na závěr stanoví poměr obou fluorochromů. Pokud na některém místě jedna z barev převládá,

lze předpokládat, že zde nastala amplifikace či delece, a to podle barvy, která v místě dominuje (28,31).

Metoda je využívána k detekci delecí a duplikací (28).

Ve studii 561 rodin s 1083 členy roku 2009 testovali za pomoci vysokorozlišovací array CGH mikrodelece v genu NF1, za účelem zlepšení jejich identifikace. Ověřovali mikrodelece, které byly již dříve charakterizovány pomocí mikrosatelitů a RT-PCR. Dosáhli úspěšnosti v rozlišení 3 typů mikrodelecí (typ 1, typ 2 a atypická mikrodelece) (11).

3.6. DHPLC

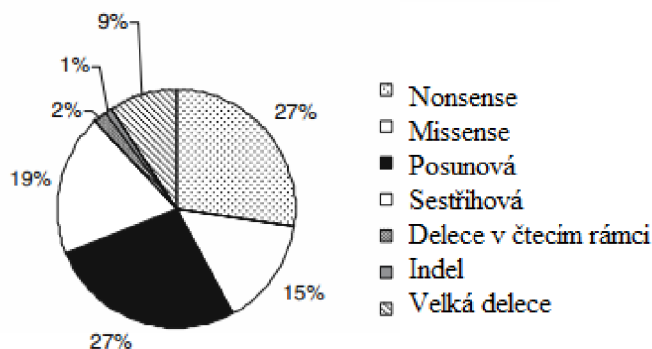
Metoda je založena na detekci heteroduplexů. Principem je separace PCR produktů v chromatografické koloně na neporézní matrici. Kolona se nachází v prostředí s určenou teplotou, separace probíhá v denaturačním prostředí. Na matrici je vytvořen kladný náboj a poté je nanesen vzorek, NK je pak schopna nekovalentního navázání. Po lineárně se zvyšující koncentraci acetonitrilu, díky které je provedena eluce NK, je zhodnocena síla vazby NK na matrici, která závisí na počtu záporných nábojů a na velikosti analyzovaného fragmentu. V případě detekce sekvenční změny je daný fragment podroben sekvenování, které určí typ a lokalizaci mutace (32).

Metoda byla označena za vysoce citlivou a rychlou detekční metodu, vhodnou k použití pro screening řady komplexních poškození genů. Metoda je schopna detekovat multiexonové a velké delece, tvořící asi 20 % mutací u NF1. Metoda byla použita v retrospektivní analýze 111 pacientů se známým genovým poškozením, kde prokázala 97 % citlivost (správně analyzovala 108 pacientů). Studie dokonce uvádí, že při zvýšení teploty o 2°C nad maximální doporučenou teplotu, může být účinnost metody mírně zvýšená (32).

V následné kohortové studii 50 nepříbuzných pacientů bylo detekováno 34 změn (19 sporadických a 15 familiárních), což udává míru detekce na 68 % (32).

V letech 2000 až 2005 se studie zabývala 201 nepříbuznými pacienty s onemocněním NF1 a detekovala metodou DHPLC v kombinaci s PTT z analyzovaného počtu 138 pozitivních jedinců (9).

V dvouleté studii (2003-2005) bylo testováno 169 nepříbuzných pacientů. Byl analyzován celý gen NF1 i s přilehlými sestřihovými oblastmi. Kombinovaly se metody dHPLC, MLPA a FISH. Bylo detekováno 109 mutací (64 %). 88 případů zahrnovalo sekvenční změny genu, z nichž 57 byly změny nové. Spektrum detekovaných mutací je znázorněno na obr. 9 (33).



Obrázek 9 Mutační spektrum genu NF1 ze studie 109 pacientů (33)

3.7. PTT

Metoda testu přítomnosti zkráceného proteinu byla objevena v roce 1993. Detekuje mutace předčasně ukončující translaci, a to v důsledku předčasného vytvoření stop kodonu. Detekce mutací probíhá na úrovni proteinů. Analyzuje velké genové fragmenty (2-3 kb) a pouze patologické mutace způsobující vznik neúplné bílkoviny, ignoruje polymorfismy. Nedetekuje missense mutace, malé inzerce nebo delece vedoucí k mnoha biologicky významným mutacím (29,32).

Nejprve se naamplifikuje pomocí PCR část genomické DNA (mRNA), následně proběhne transkripce produktu do RNA. Přítomný zkrácený protein je separován elektroforeticky podle své délky v SDS polyakrylamidovém gelu a vizualizován stříbřením. Celé vyšetření trvá cca 6 hodin.

Podle studie z roku 2001 byl test PTT úspěšný v detekci mutací NF1 v rozmezí 47 % a 83 % (32).

3.8. Southern blotting

Southern Blotting byl objeven roku 1975 E. M. Southernem. Metoda umožňuje určit molekulovou hmotnost restričních fragmentů, relativní množství u různých vzorků a lokalizovat konkrétní sekvence DNA v komplexní směsi. Metoda se hojně využívala před zavedením metody PCR. Je velmi nákladná a složitá. V dnešní době se využívá spíše k výzkumným účelům (27,29).

DNA je štěpena restričními enzymy a poté elektroforeticky rozdělena a přenesena z agarózového gelu na membránu, která je následně inkubována se sondou, která je

komplementární k úseku DNA. Sonda je značená buď enzymaticky či radioaktivně, čímž umožňuje následnou vizualizaci (27,34).

Southernova metoda je v porovnání s metodou PCR časově náročnější, ale velice spolehlivá v detekci velkých delecí, duplikací, inverzí, inzercí a amplifikací tripletů repetitivních sekvencí (28).

3.9. Heteroduplexní analýza

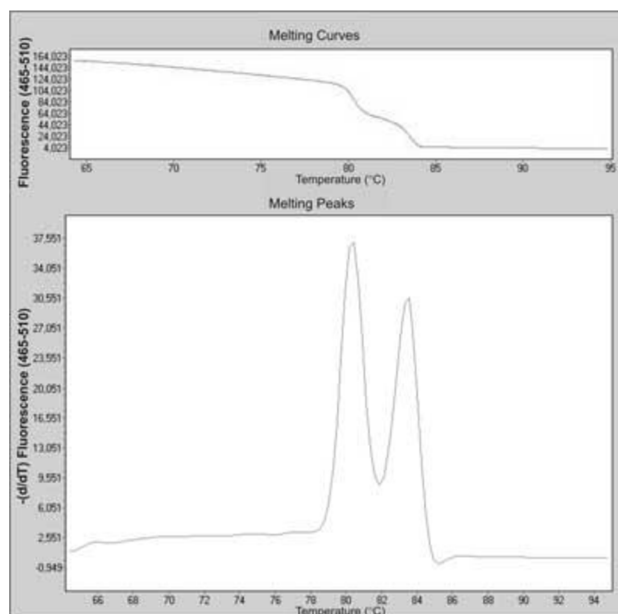
Metoda založená na denaturaci a opětovné renaturaci PCR produktu mutovaného a zdravého vzorku. Dochází k spojení mutované i normální DNA a vznikají tak heteroduplexy. Heteroduplexy mají na rozdíl od homoduplexů rozdílnou pohyblivost při elektroforéze (26).

Při mutační analýze genu NF1 (67 pacientů) byla metoda HA využita v případě, že metoda PTT neanalyzovala žádnou mutaci, byla doplněna metodou FISH, Southern blottingem a cytogenetickou analýzou. Bylo nalezeno 6 missense mutací (9 % pacientů) a delece jedné aminokyseliny (24).

3.10. HRM

Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM) se řadí mezi vysoce citlivou a rychlou metodu. Dokáže zachytit jedno i více nukleotidové záměny a indely (inzerce/delece) v DNA ať už u heterozygota či u homozygota.

Při postupném zahřívání dvoušroubovice DNA dochází k jejímu tavení a uvolňuje se z ní DNA saturující barvivo a tím dochází k poklesu fluorescence. Pokud je v testovaném vzorku DNA přítomen heteroduplex, nastane změna tvaru křivky tání. Změna tvaru křivky tání je charakteristická pro určitou záměnu na určité pozici. Pokud použijeme neznačené sondy, dokážeme určit i homozygotní variantu mutace (35).



Obrázek 10 Křivka tání a píky tání u heterozygotní mutace v exonu 23 (36)

3.11. Přímá sekvenace

Přímá sekvenace poskytuje nejpřímější důkaz vzniku mutace. Stanoví primární strukturu (pořadí nukleotidů) v molekulách DNA.

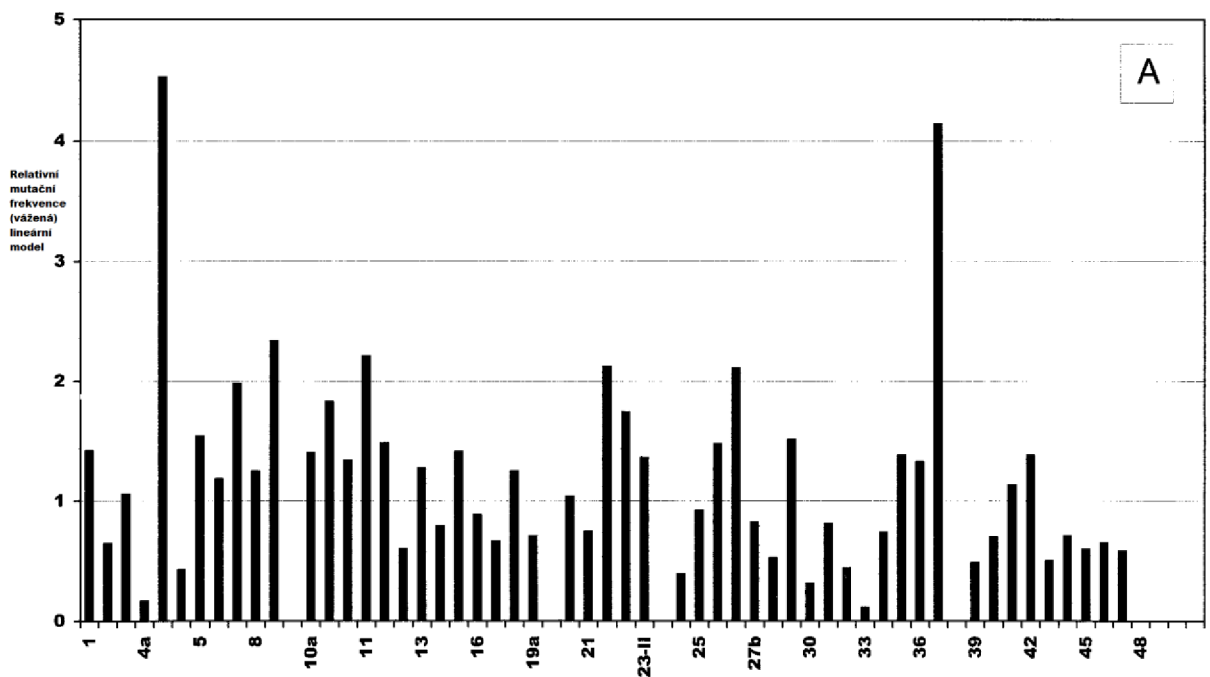
Sangerova reakce je založena na začlenění fluorescenčně značených dideoxynukleotidů (ddNTP) do DNA, které působí jako specifické inhibitory DNA polymerázy. Začlenění ddNTP do molekuly DNA tedy způsobí ukončení syntézy DNA. Jednotlivé ddNTP jsou značené odlišným fluorochromem, který je možno detekovat na základě odlišných emisních spekter. Tím vzniká velká škála různě dlouhých produktů. Po separaci od nadbytečných nukleotidů je vzorek oddělen díky kapilární elektroforéze, která bývá součástí sekvenátoru. Fotooptický systém přečte sekvence, s kterými díky příslušnému softwaru může dále pracovat (27,37).

Druhou metodou sekvenování je metoda dle Maxama a Gilberta, metoda je založená na chemické reakci štěpící terminálně značené báze, které jsou následně rozděleny elektroforeticky v polyakrylamidovém gelu. Metoda Maxam a Gilbert se už v praxi nepoužívá (37).

Tyto metody byly postupně zdokonalovány, aby dosáhly co nejvyšší úspěšnosti. Z původních přečtených 100 bází za jeden běh byly zdokonaleny až k 1000 bázím v jednom běhu. K sekvenování celých genomů však nebyly příliš vhodné díky zdlouhavosti a finanční

náročnosti, usoudilo se, že se dostaly na maximum kapacitních možností a začalo se bádát na levnější a výkonnější technologii (37).

Roku 2000 byla vedena studie 521 nepříbuzných pacientů německého či tureckého původu, kteří byli vyšetřováni pomocí metody PTT, TGGE či DGS na mutace v genu NF1. Účinnost metod byly podobné (PTT 47,1 %, TGGE 53,7 %, DGS 54,9 %). Bylo nalezeno 301 sekvenčních změn, z nichž 278 bylo vyhodnoceno za patogenní. Následující diagram (Obr. 11) ukazuje rozložení mutací v exonech 1-47, které byly vyhodnoceny na základě výsledků studie. U každého exonu byl počet patogenních mutací přepočten na počet bází, z toho přepočtu vyplývá vyšší výskyt mutace u exonu 4b a exonu 37 (38).



Obrázek 11 Rozdělení mutací v exonech 1-47 na genu NF1 (38)

Na OLG FN Brno se využívá sekvenování exonů na DNA úrovni a cDNA, která byla připravena reverzní transkripcí z RNA. Výhodou reverzní transkripce je následná detekovatelnost sestřihových mutací, analyzované úseky cDNA pokrývají celou kódující oblast genu NF1.

3.12. NGS

Principem metody sekvenování nové generace (NGS) je ukotvení miliónů sekvenčních reakcí na čip a současná detekce jednotlivých reakcí pomocí vysoce citlivých detekčních technik. Například firma Illumina náhodně uchytili milióny fragmentů DNA na čip. Jednotlivé fragmenty jsou namnoženy, čímž se zvýší signál pro detekci. Poté je čip promyt fluorescenčně značenými nukleotidy, ty jsou upraveny, aby se na komplementární DNA fragment vždy navázal jen jeden nukleotid. Po navázání nukleotidy je pořízen obrázek. Pokračuje syntéza a po každém kroku je pořízen obrázek. Ve výsledku je z obrázků počítač sestaví sekvenci každého fragmentu v daném místě, a tak získá sekvence miliónů fragmentů z jednoho čipu. Na základě překryvů je pak poskládána do souvislé DNA (pokud o souvislou DNA původně šlo) (39).

Sekvenování nové generace je schopno za den vyprodukovat okolo 1-2 gigabáze sekvenčních dat. I přes dosažené úspěchy je nevýhodou NGS jeho nákladnost (37).

3.13. qPCR

Metoda kvantitativní PCR je založena na stejném principu jako klasická PCR reakce, umožňuje však navíc kvantifikaci sledovaného úseku DNA.

Kvantifikace je možná díky sondám označeným fluorescenčním barvivem. Tato sonda má stejné podmínky k hybridizaci s vyšetřovanou DNA jako primer. Po denuraci se na místo, které leží mezi sekvencemi, k nimž nasedají protisměrně navázané primery, připojí sonda. DNA polymeráza narazí při syntéze komplementárního vlákna na navázanou sondu a projeví exonukleázovou aktivitu (sondu odbourá a na její místo poskládá nukleotidy z reakční směsi), nukleotidy z původního řetězce sondy jsou uvolňovány do roztoku. Některé sondy jsou označeny fluorescenčním barvivem, které fluoreskuje, jakmile se uvolní do roztoku. Díky tomu v průběhu PCR dochází k nárůstu intenzity fluorescence a tento nárůst je přímo úměrný množství amplikonů, které při reakci vznikají. Tato metoda vyžaduje speciální termocyclery, ve kterých je vzorek ozařován excitačním UV zářením (28).

Pomocí metody qPCR detekujeme delece či amplifikace, v případě mikrodelečních syndromů či aneuploidií lze tímto vyšetřením nahradit metodu FISH (28).

Roku 2011 zavedl Valero a kol. genetický protokol pro molekulární diagnostiku NF1. Protokol byl založen na detekci mutací pomocí RT-PCR, MLPA a DHPLC. Protokol byl validován ve studii 56 nepříbuzných pacientů. Bylo nalezeno 53 pozitivních pacientů, což značilo 95 % úspěšnost (25).

3.14. MLPA

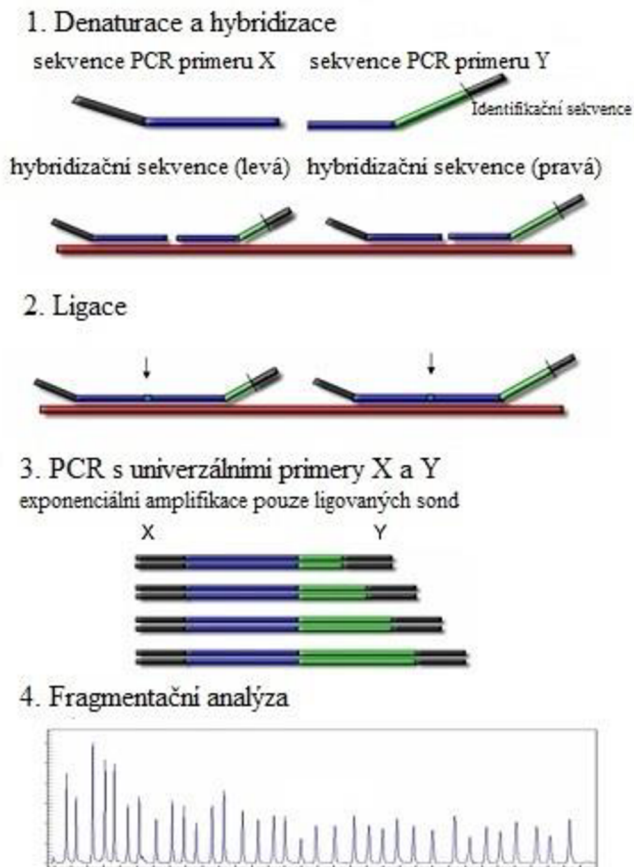
Technika MLPA (Multiplex ligation - dependent probe amplification) je multiplexní PCR metoda schopná detekovat abnormální početní kopie a dokáže rozlišit i sekvence lišící se pouze v jednom nukleotidu. Metoda MLPA vyžaduje termocykler a zařízení kapilární elektroforézy. Do 24 hodin dokáže zpracovat a poté vyhodnotit až 96 vzorků (40).

Reakce se dělí do pěti kroků: denaturace DNA s následnou inkubací směsi MLPA sond, hybridizace s následnou ligací, PCR ligovaných sond, rozdělení amplifikačních produktů a konečným krokem je vyhodnocení, kde se porovnává vyšetřovaný pacient vůči negativní kontrole (40).

Princip reakce je v navázání oligonukleotidových sond k cílové sekvenci DNA, a to dle pravidel komplementarity (C-G, A-T). Navázané sondy jsou v dalším kroku spojeny ligací. A pouze tyto sondy se v další fázi amplifikují pomocí klasické PCR. V posledním kroku jsou produkty rozděleny dle jejich délky kapilární elektroforézou a vyhodnoceny.

Vzhledem k tomu, že PCR reakce navazující na ligační reakci, amplifikuje jen ligované sondy, je počet produktů ukazatelem cílových sekvencí v testovaném vzorku (40).

MLPA kit pro diagnostiku NF1 je vzhledem k velkému počtu exonů rozdělen do dvou částí (viz Obr. 1, 2 v příloze). Jednotlivé vzorky se v závěru porovnávají s kontrolou zdravého jedince. Existuje i kit P122-C2 NF1 AREA, který je využíván k stanovení delecí/duplikací genu NF1 a přilehlých oblastí. Je využíván v případě delece/duplikace celého genu, a to k došetření velikosti delece/duplikace, kam až dosáhla (viz Obr. 3 v příloze) (40).



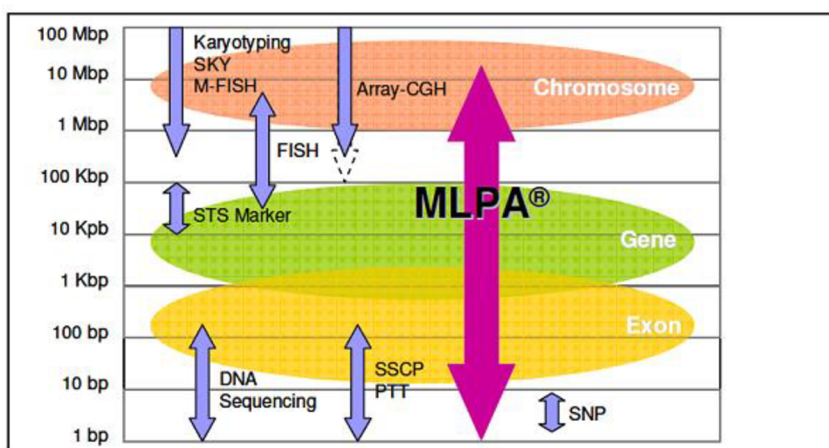
Obrázek 12 Postup metody MLPA (40)

Výhody

Metoda detekuje delece i duplikace jedné nebo více sekvencí genu NF1 na úrovni exonů. Pro MLPA metodu postačí malé množství DNA. Výhodou je, že dokáže v jedné reakci detekovat abnormality velkého množství cílových sekvencí (40).

Nevýhody

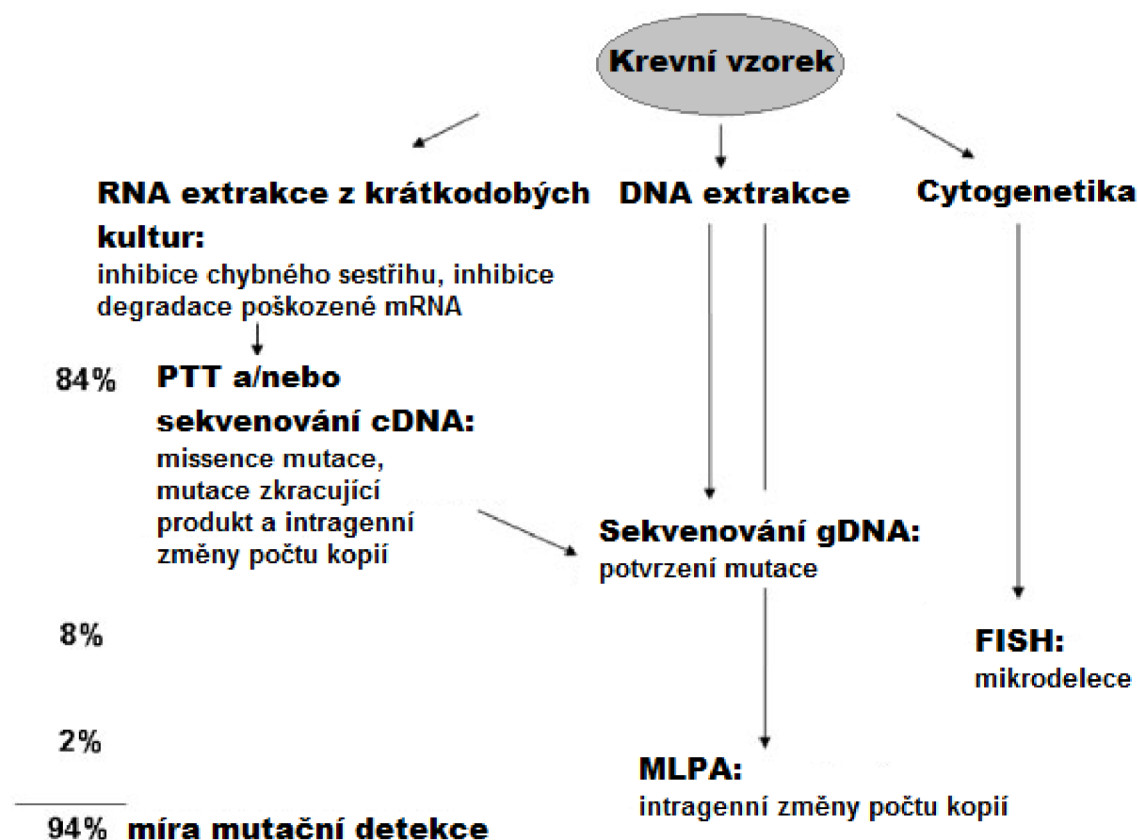
Nevýhodou metody může být velká citlivost k čistotě vzorku a také neschopnost detekovat neznámé mutace. Pokud dojde k záměně několika nukleotidů v ligačním místě sond, může to ovlivnit výsledky vyšetření (40).



Obrázek 13 Srovnání citlivosti metody MLPA s ostatními metodami používanými k detekci NF1 (40)

Ve studii z roku 2007 zabývající se 201 italskými pacienty s onemocněním NF1, kde 138 pacientů bylo vyloučeno z důvodu dřívějšího testování metodami dHPLC a PTT (zjištěna heterozygotnost pro intragenové bodové mutace, delece či inserce), byla u zbývajících 63 pacientů provedena analýza pomocí metody MLPA. U pacientů byla vyšetřována delece či duplikace (i více než jednoho exonu) a také delece celé části genu. Výsledky byly ověřeny metodou qPCR nebo metodou FISH. Bylo detekováno 23 delecí, z nichž 6 bylo jedno exonových, 8 více exonových a 9 celogenových. Vyvodili závěr, že 14 více exonových delecí z 201 pacientů (7 %) by mělo být podnětem k systematickému začlenění screeningu do genetického testování pacientů s NF1. 7 % úspěšnost více exonových delecí byla vyšší než u studie zabývající se 1100 pacienty, kde detekovali více exonovou deleci u 25 pacientů (2 %) a nižší než u studie zabývající se 30 pacienty, kde byla tatáž delece nalezeny u 3 pacientů (10 %) (9,41,42).

V další studii z roku 2007, která se zabývala 97 pacienty, bylo detekováno 94 pozitivních pacientů. Metoda MLPA byla zařazena po nulových výsledcích metod PTT, přímého sekvenování a FISH, schéma analýzy (Obr. 14)



Obrázek 14 Schéma mutační analýzy (24)

4. PRAKTICKÁ ČÁST

Pro diagnostiku velkých delecí a duplikací onemocnění NF1 bylo použito 8 vzorků periferní krve od náhodně vybraných pacientů (Obr. 16). Izolace DNA proběhla na OLG FN Brno či DNA byla zaslána z jiných laboratoří. Izolace není zahrnuta v popisu mé práce.

Vzhledem k velkému počtu exonů je MLPA kit pro NF1 rozdělen na dvě části. Pro vyšší počet mutací v exonu 1, je zařazen do obou probemixů. Ukázka rozdělení (Obr. 15).

	SALSA MLPA P081-B2 probemix 1	SALSA MLPA P081-B2 probemix 2
Exon	1	1
	28	30
	57	53
	2	3
	32	34
	4	5
	35	36
	6	1
	37	8
	11	38
	39	10
	26	40
	41	44
	13	12
	47	46
	15a	14
	49	48
	17	16
	50	51
	21	20
	52	55
	58	25
	29	33
	18	27
	42	43
	23	49
	45	
Intron	36	36

Obrázek 15 Rozdělení probemixů

4.1. Chemikálie

- SALSA MLPA kit P081-B1/P082-B1 NF1 mix (MRC-Holland)
- Pufr: CE Running Pufr pro DNA analyzátořy ABI 3100/3130 (Carolina Biosystems)
- Polymer: POP7 Polymer pro DNA analyzátořy ABI 3100/3130 (Applied Biosystems)
- Size standard GT600 (Genomac)
- Voda
- Hi-Di formamid (Applied Biosystems)

4.2. Přístrojové vybavení

- automatické pipety (Eppendorf) objem: 0,5-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l
- minicentrifuga: Quickspin (Labnet)
- mikrocentrifuga (Labnet)
- centrifuga: 5804 (Eppendorf)
- vortex: Reax Top (Heidolph)
- termocycler: TC-412 (Techne)
- lednice
- mrazák
- sekvenátor: ABI 3130 (XL) (Applied Biosystems)
- termocycler: XP cycler (Bioer)

4.3. Materiál

- špičky (Eppendorf)
- zkumavky 1,5 ml (Biotech)
- eppendorfkky 0,2 ml (Eppendorf)
- soubor testovaných pacientů

Ročník	Pohlaví	Kód pacienta
1994	Ž	2092/13
2006	Ž	253/12
2012	Ž	2037/13
1973	Ž	1978/13
2000	M	1979/13
2007	M	2089/13
1936	Ž	2005/13

Obrázek 16 Soubor testovaných pacientů

4.4. Program analýzy

- software Coffalyser

4.5. Postup

Den první, denaturace DNA

Použila jsem 100 ng DNA izolované na oddělení OLG FN Brno nebo zaslané z jiných laboratoří, koncentrace a čistota vzorků byla změřena na OLG FN Brno.

První den se napipetuje 5 µl DNA z každého vzorku do jednotlivých zkumavek, které se předem popíšu a umístí do termocycleru. Poté se spustí program MLPA (schéma programu níže). DNA se denaturuje po dobu 5 minut při teplotě 98°C, poté nastane pauza při teplotě 25°C.

Denaturace DNA	Hybridizační reakce	Ligační reakce	PCR reakce
1. 98°C 5 minut	3. 95°C 1 minuta	5. 54°C pauza	9. 35 cyklů:
2. 25°C pauza	4. 60°C pauza	6. 54°C 15 minut	95°C 30 vteřin
		7. 98°C 5 minut	60°C 30 vteřin
		8. 20°C pauza	72°C 60 vteřin
			10. 72°C 20 minut
			11. 15°C pauza

Hybridizační fáze

Poté se zvertexuje MLPA buffer a probemix a připraví se master mix obsahující 1,5 µl MLPA bufferu a 1,5 µl MLPA probemixu. Směs se dobře promíchá. Po denuraci DNA se

napipetuje do každé zkumavky 3 μ l master mixu a obsah se dobře promíchá. Směs se inkubuje po dobu 1 minuty při teplotě 95°C, poté po dobu 18 hodin přetrvávala při teplotě 60°C.

Den druhý, ligační fáze

Před použitím se zvortexují oba ligázové pufry. Připraví se master mix Ligáza-65. Napipetuje se 25 μ l destilované vody, 3 μ l ligázového bufferu A, 3 μ l ligázového bufferu B a jako poslední složka master mixu se přidá 1 μ l enzymu ligáza-65. Směs se opatrně a pečlivě promíchá, nesmí se vortexovat kvůli přítomnosti enzymu. Pokud by však promíchání neproběhlo správně, může dojít k nespolehlivému výsledku. Následuje pauza při 54°C. Když jsou vzorky vytemperované na 54°C, přidá se do každé zkumavky 32 μ l ligázového master mixu. Vzorky se opět opatrně promíchají pipetou. Pokračuje 15 minutový program při 54°C, kdy dojde k ligaci a 5 minutový program při 98°C pro tepelnou inaktivaci enzymu Ligasa-65. Poté nastane pauza při 20°C. V tomto bodu se vyjmou zkumavky z termocycleru.

Den druhý, PCR reakce

Zvortexuje se SALSA PCR prime mix. V rukou se po dobu asi 10 vteřin zahřeje polymeráza, aby se zredukovala viskozita. Připraví se polymerázový master mix, který pro jednu reakci obsahuje 7,5 μ l destilované vody, 2 μ l SALSA PCR primer mixu a 0,5 μ l SALSA polymerázy. Opatrně se směs promíchá pipetou a směs se udržuje na ledě.

Do každé zkumavky se přidá 10 μ l polymerázového mixu, směs se promíchá pipetou a nechá se pokračovat program, skládající se z 35 cyklů (30 vteřin při teplotě 95°C, 30 vteřin při teplotě 60°C, 60 vteřin při teplotě 72°C). Program končí 20 minutovým programem při 72°C, pauzou při 15°C.

Po PCR reakci by se zkumavky neměly otvírat v místnosti s termocyclerem, aby nedošlo ke kontaminaci. PCR produkt může být uchován po dobu jednoho týdne při teplotě 4°C, pro delší uchování musí být teplota snížena na hodnotu mezi -15°C až -25°C. Jelikož jsou fluorescenční barviva fotosenzitivní, měl by být produkt PCR umístěn ve tmě.

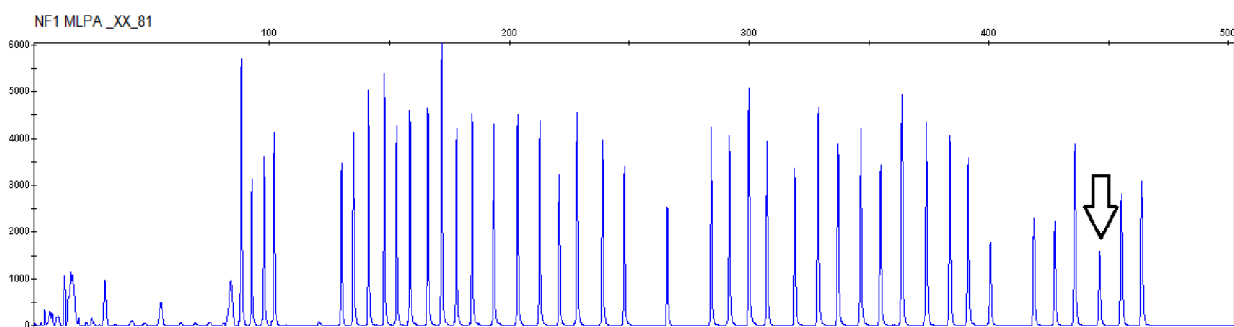
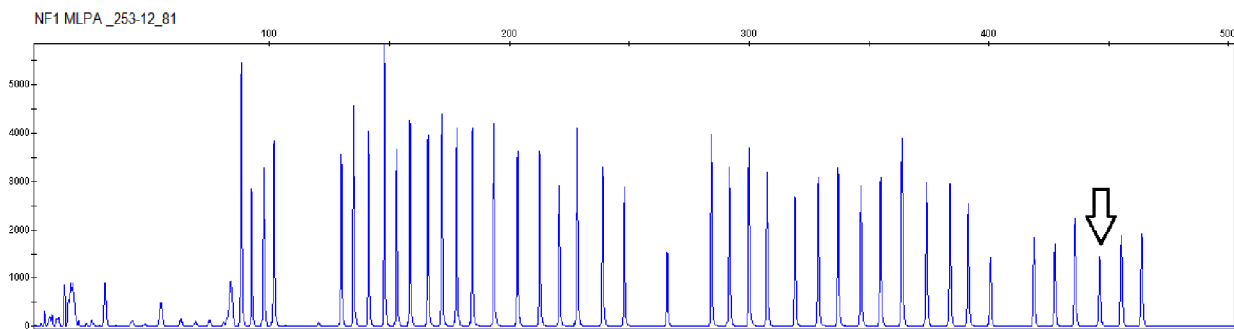
4.6. Vyhodnocení

Vyhodnocení se provádí prostřednictvím softwaru Coffalyser. Srovnává se negativní kontrolní vzorek se vzorkem pacienta. U fragmentační analýzy se porovnává výška píku, která je v případě delece zkrácená a v případě duplikace prodloužená.

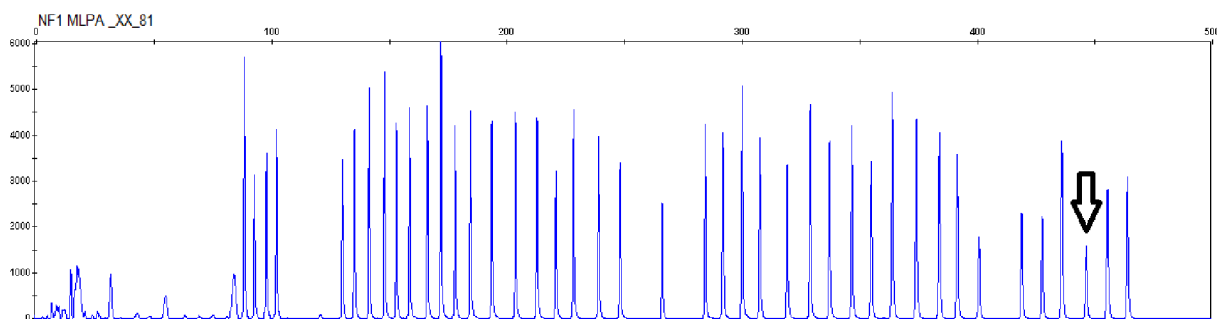
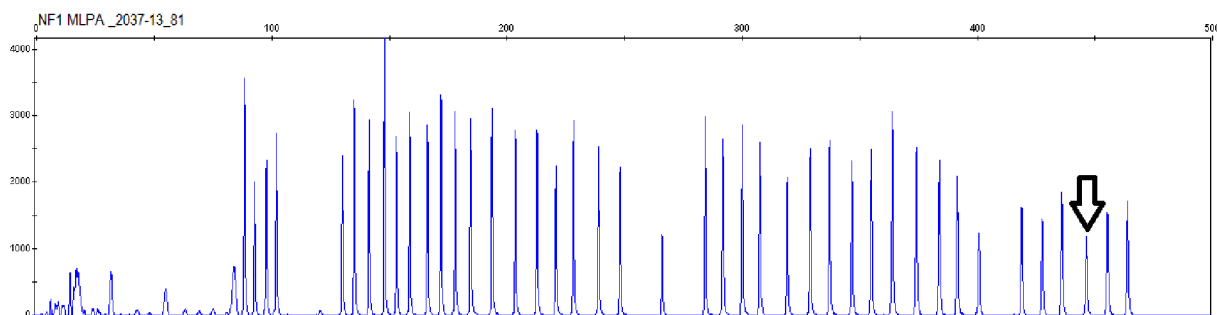
U vzorků, které jsem vyšetřovala, nebyla nalezena žádná delece či duplikace. Příkládám výstup ze softwaru Coffalyser (Obr. 17), který sice hlásil amplifikaci u vzorku číslo 2037 a vzorku číslo 253 (exon 23 hodnota 1,31), ale jelikož je pro zdravého člověka poměr v rozmezí hodnot 0,7-1,3 považován za normální, bylo hlášení hodnoty 1,31, které je těsně na hranici zdravého člověka, považováno za normální. Tyto hodnoty byly zkontrolovány na výstup z fragmentační analýzy (Obr. 18, 19).

Cilové sondy - sada 81		All Samples							Refe...
		NF1-MLPA 2037-13 81	NF1-MLPA 253-12 81	NF1-MLPA 1978-13 81	NF1-MLPA 2005-13 81	NF1-MLPA 1979-13 81	NF1-MLPA 2089-13 81	NF1-MLPA 2092-13 81	NF1-MLPA XX 81
0	17-026445712 - NF1-1	0.97	0.94	1.01	0.95	0.98	0.93	0.98	1.00
1	17-026507125 - NF1-2	1.11	1.09	1.15	1.08	1.06	1.06	1.03	1.00
2	17-026514364 - NF1-4	1.21	1.16	1.19	1.18	1.18	1.13	1.12	1.00
3	17-026532562 - NF1-6	1.04	0.98	1.01	0.99	1.02	0.98	0.98	1.00
4	17-026552886 - NF1-11	1.09	1.12	1.12	1.11	1.10	1.08	1.00	1.00
5	17-026565642 - NF1-13	1.20	1.21	1.19	1.16	1.18	1.11	1.05	1.00
6	17-026572706 - NF1-15	1.13	1.06	1.08	1.07	1.04	1.03	1.02	1.00
7	17-026576312 - NF1-17	1.17	1.13	1.16	1.11	1.12	1.09	1.00	1.00
8	17-026577754 - NF1-18	1.24	1.13	1.12	1.16	1.13	1.15	1.03	1.00
9	17-026580375 - NF1-21	1.08	1.07	1.07	1.02	1.05	1.01	0.89	1.00
10	17-026581695 - NF1-23	1.31	1.31	1.28	1.27	1.29	1.24	1.06	1.00
11	17-026583936 - NF1-26	1.11	1.06	1.06	1.02	1.03	1.02	1.00	1.00
12	17-026586765 - NF1-28	1.29	1.28	1.26	1.24	1.24	1.18	1.13	1.00
13	17-026587096 - NF1-29	1.21	1.11	1.16	1.12	1.11	1.09	1.03	1.00
14	17-026609504 - NF1-32	1.03	1.01	1.04	0.97	1.01	0.97	0.95	1.00
15	17-026612879 - NF1-35	1.10	1.09	1.12	1.09	1.09	1.08	1.01	1.00
16	17-026647155 - DMG-2	0.97	0.96	0.97	0.93	0.99	0.95	0.96	1.00
17	17-026677211 - NF1-37	1.07	1.01	1.08	1.02	1.01	0.99	1.01	1.00
18	17-026681493 - NF1-39	1.08	1.04	1.08	1.05	1.03	1.03	1.06	1.00
19	17-026687519 - NF1-41	0.81	0.76	0.81	0.77	0.79	0.78	0.85	1.00
20	17-026687877 - NF1-42	1.15	1.09	1.18	1.11	1.12	1.06	1.09	1.00
21	17-026691650 - NF1-47	1.12	1.05	1.13	1.06	1.10	1.08	1.09	1.00
22	17-026700263 - NF1-49	1.07	1.05	1.13	1.01	1.05	1.03	1.02	1.00
23	17-026701324 - NF1-50	0.96	0.93	1.00	0.94	0.95	0.93	0.91	1.00
24	17-026707635 - NF1-52	1.01	0.93	0.97	0.96	0.97	0.94	0.96	1.00
25	17-026711683 - NF1-57	1.06	1.02	1.08	1.03	1.07	1.01	0.99	1.00
26	17-026725175 - NF1-58	1.01	0.98	1.07	0.98	1.02	0.96	0.97	1.00

Obrázek 17 Výstup ze softwaru Coffalyser

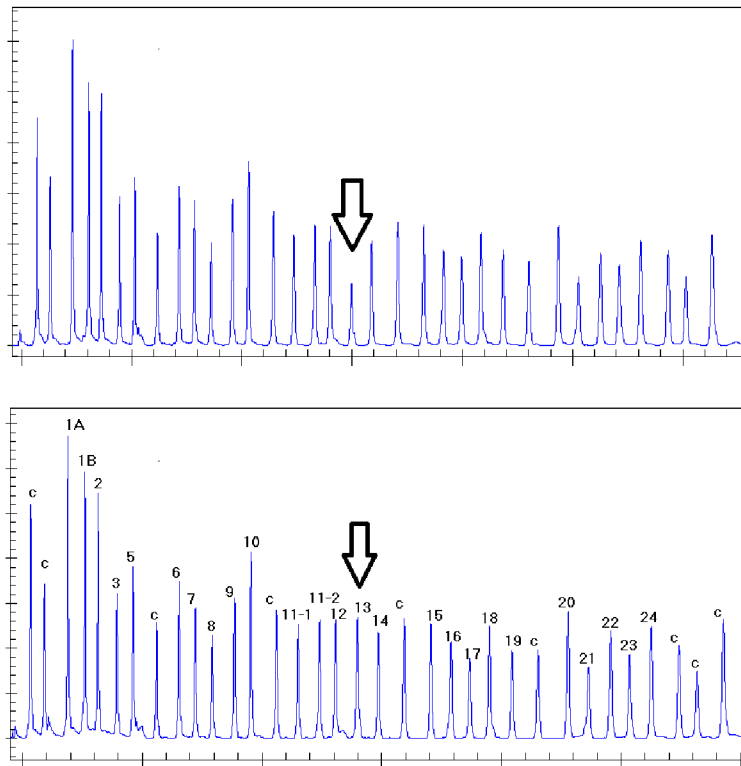


Obrázek 18 Výstup z fragmentační analýzy, pacient číslo 253



Obrázek 19 Výstup z fragmentační analýzy, pacient číslo 2037

Jelikož v testování souboru mně přiřazených pacientů delece ani duplikace nenastala, uvádím zde pro srovnání výstup z fragmentační analýzy, kde nastala delece v exonu 13, zde se pík oproti kontrolnímu vzorku zkrátil.



Obrázek 20 Ukázka zkráceného píku v případě delece v exonu 13 (40)

(pík c = kontrola, píky 1a-24 = vyšetřované exony)

5. DISKUZE A ZÁVĚR

V praktické části své bakalářské práce jsem se zabývala 7 náhodně vybranými pacienty, kteří byli vyšetřováni na OLG FN Brno a jedním kontrolním vzorkem. Jelikož je OLG FN Brno v ČR jediným místem, kde se vyšetřuje NF1, vybraní pacienti nemuseli pocházet pouze z Jihomoravského kraje. Důvod pro vyšetření vycházel ze symptomů a lékařského vyšetření.

Vzorky byly testovány na sekvenátoru ABI 3130XL (Applied Biosystems) pomocí kitu SALSA MLPA Kit P081-B1/P082-B2 (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). I přes hlášení systému Coffalyser, že u dvou vzorků je hodnota u exonu 23 zvýšená (z fyziologického rozmezí 0,7-1,3) na 1,31, bylo podezření na amplifikaci vyvráceno následnou kontrolou výstupu z fragmentační analýzy. Ve výsledku byli všichni pacienti v detekci na delecii či duplikaci negativní.

Detekce pomocí metody MLPA zastupuje v praxi první místo a jsou jí běžně vyšetřováni všichni pacienti podezřelí pro NF1. Metoda je schopna detekovat velký rozsah delecí, od jedno exonových delecí/duplikací po delece celého genu NF1. Ověření metody MLPA lze provést metodou qPCR, z cytogenetických metod lze použít metodu array CGH či FISH, a to podle rozsahu delece. Mezi výhody metody MLPA patří nízká koncentrace vstupní DNA a možnost detekovat v jednom běhu abnormality velkého množství cílových sekvencí. Na druhou stranu, za nevýhodu bych uvedla velkou citlivost k čistotě vzorku a neschopnost detekovat neznámé mutace, kterých se vzhledem k rychlosti nárůstu objevuje neustále větší množství. Například ve studii 60 pacientů byly objeveny u dvou pacientů mutace v exonu 22, tento exon však v panelu vyšetření zahrnut není (40,43).

Metodou volby bych v případě detekce neznámých mutací zvolila metodu sekvenace či stále se rozvíjející oblast NGS.

Pro přehlednost přikládám tabulku (Obr. 21), která uvádí metody a k nim přiřazené mutace, které jsou schopny detekovat.

Metoda	Mutace
SSCP	polymorfismy, bodové změny
DGGE	menší mutační poškození
TGGE	menší mutační poškození
FISH	velké delece
Array CGH	delece, duplikace
DHPLC	multiexonové a rozsáhlé delece
PTT	velké delece ukončující translaci
HA	delece, duplikace, substituce
Southern Blotting	malé delece, duplikace
qPCR	delece, duplikace
HRM	indely, jedno i více nukleotidové záměny
Přímá sekvenace	všechny typy
NGS	všechny typy
MLPA	delece, duplikace

Obrázek 21 Srovnání metod v detekci mutací

U onemocnění NF1 se nejvíce vyskytují malé delece (335, k prosinci 2013), k jejich detekci se v praxi využívá hlavně metoda MLPA. MLPA však může být využita jen v případech, že jde o delece/duplikace exonů, které obsahuje SALSA MLPA Kit P081-B1 nebo P082-B2. Druhé nečastější mutace jsou mutace missense/nonsense (297, k prosinci 2013) a třetí nejčastější jsou mutace sestřihové (279, k prosinci 2013), které se detekují pomocí sekvenování cDNA (13,40).

Nepřímá analýza se pro diagnostiku NF1 používá u rodin se dvěma a více členy, u kterých nebyla nalezena konkrétní mutace. Mezi její přednosti patří předpověď rizika členů rodiny a vhodnost k prenatální diagnostice. Nepotvrdí ale ani nevyvrátí klinickou diagnózu (26).

Z přímé diagnostiky se v dnešní době využívají hlavně metody MLPA, qPCR, NGS, a DHPLC, z cytogenetických metod bych jmenovala array CGH a FISH.

V následujícím odstavci bych zmínila i metody, které se již nepoužívají a uvedla jejich přínos do diagnostiky NF1 či jejich účinnost.

Metoda SSCP se využívala k detekci polymorfizmů a bodových změn. Účinnost se v takovém případě udává mezi 70-80 %. K menšímu mutačnímu poškození se využívala metoda DGGE, které náleží 95 % účinnost, či metodu TGGE. DHPLC se hodí k detekci multiexonových delecí, ve studii pak dosáhla až 97 % úspěšnosti. Southern blotting se úspěšně prokázal v detekci velkých delecí, duplikací, inverzí, inzercí a amplifikací tripletů

repetitivních sekvencí. Metoda PTT se prokázala v detekci mutací předčasně ukončující translaci. Ve studii detekující mutace genu NF1 pak vyšla účinnost mezi 47-83 %. HA se užívá k detekci malých delecí/duplikací, kdy dosahuje 100 % účinnosti a 70-80 % účinnost pro detekci substitucí. qPCR je vhodná k detekci delecí či amplifikací. Metoda HRM se využívá k detekci indelů a jedno i více nukleotidových záměn. Přímé sekvenování se ve většině studií využívalo jako doplňující vyšetření jednotlivých metod. Ve studii doplňující PTT a TGGE dosáhlo 54,9 % úspěšnosti. Metoda MLPA je schopna detekovat delece či duplikace. Ve studii pak dosáhla 97 % účinnosti. Poslední jmenovanou metodou je sekvenování nové generace. NGS je vhodné pro sekvenování nově nalezených mutací. Z cytogenetických metod bych jmenovala metodu Array CGH či FISH, tyto metody jsou schopny detekovat větší delece či duplikace (4,13,24,27–30,32).

Na OLG FN Brno se provádí vyšetření metodou MLPA. V případě, že se pomocí MLPA mutace nenalezne, přechází se k sekvenování cDNA či k metodě NGS. Naopak, když je mutace nalezena, k ověření je použita metoda qPCR, sekvenace nebo se opakuje MLPA vyšetření.

Na závěr bych zdůraznila výhodu metody MLPA, kterou je, oproti ostatním metodám, schopnost detekovat delece/duplikace, které by byly jinými metodami komplikované. K vyšetření vyžaduje DNA, která je oproti RNA snáz izolovatelná. Další výhodou je složení kitů, které obsahují téměř všechny exony. Díky tomu je metoda MLPA nezastupitelnou součástí diagnostiky NF1.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Boyd KP, Korf BR, Theos A. Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(1):1–16.
2. Petrák B, Plevová P, Novotný J, Foretová L. [Neurofibromatosis von Recklinghausen]. *Klin Onkol*. 2009;22 Suppl:S38–44.
3. Reynolds RM, Browning GGP, Nawroz I, Campbell IW. Von Recklinghausen's neurofibromatosis: neurofibromatosis type 1. *Lancet*. 2003;361(9368):1552–4.
4. Abernathy CR, Rasmussen SA, Stalker HJ, Zori R, Driscoll DJ, Williams CA, et al. NF1 mutation analysis using a combined heteroduplex/SSCP approach. *Human Mutation*. 1997;9(6):548.
5. NF1 - neurofibromin 1 [Internet]. 2014 [citován 23. březem 2014]. Dostupné z: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/NF1>
6. Alkindy A, Chuzhanova N, Kini U, Cooper DN, Upadhyaya M. Genotype-phenotype associations in neurofibromatosis type 1 (NF1): an increased risk of tumor complications in patients with NF1 splice-site mutations? *Hum Genomics*. 2012;6:12.
7. Brinckmann A, Mischung C, Bässmann I, Kühnisch J, Schuelke M, Tinschert S, et al. Detection of novel NF1 mutations and rapid mutation prescreening with Pyrosequencing. *Electrophoresis*. 2007;28(23):4295–301.
8. Sabbagh A, Pasmant E, Imbard A, Luscan A, Soares M, Blanché H, et al. NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type I genotype-phenotype correlation: the French experience. *Hum Mutat*. 2013;34(11):1510–8.
9. De Luca A, Bottillo I, Dasdia MC, Morella A, Lanari V, Bernardini L, et al. Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet*. 2007;44(12):800–8.
10. Lv M, Zhao W, Yan L, Chen L, Cui K, Gao J, et al. Screening for mutation site on the type I neurofibromatosis gene in a family. *Childs Nerv Syst*. 2012;28(5):721–7.
11. Pasmant E, Sabbagh A, Masliah-Planchon J, Haddad V, Hamel M-J, Laurendeau I, et al. Detection and Characterization of NF1 Microdeletions by Custom High Resolution Array CGH. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2009;11(6):524–9.
12. Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, et al. A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity. *Mol Cell Biol*. 1993;13(1):487–95.
13. HGMD® home page [Internet]. [citován 27. únor 2014]. Dostupné z: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>
14. Park KC, Choi HO, Han WS, Hwang JH, Park KH, Kim KH, et al. Identification of two novel frame shift mutations of the NF1 gene in Korean patients with neurofibromatosis type 1. *Journal of Korean Medical Science*. 2000;15(5):542–4.

15. Zhu Y, Parada LF. Neurofibromin, a Tumor Suppressor in the Nervous System. *Experimental Cell Research*. 2001;264(1):19–28.
16. Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol*. 1988;45(5):575–8.
17. Ozhan B, Ozguven AA, Ersoy B. Neurofibromatosis type 1 and diabetes mellitus: an unusual association. *Case Rep Endocrinol*. 2013;2013:689107.
18. Koeller KK, Rushing EJ. From the Archives of the AFIP: Pilocytic Astrocytoma: Radiologic-Pathologic Correlation1. *RadioGraphics*. 2004;24(6):1693–708.
19. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *Pediatrics*. 2009;123(1):124–33.
20. Jett K, Friedman JM. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med*. 2010;12(1):1–11.
21. Lischovi čvorići - K-L - Medicinski eponimi - Medicinski eponimi - Perpetuum Lab [Internet]. Perpetuum Lab Forum. [citován 27. březen 2014]. Dostupné z: http://perpetuum-lab.com.hr/medicinski_eponimi/_/k-l/lischovi-evorici-r68
22. Lakshmaiah KC, Kumar AN, Purohit S, Viveka BK, Rajan KR, Zameer MAL, et al. Neurofibromatosis type I with breast cancer: not only for women! *Hered Cancer Clin Pract*. 2014;12(1):5.
23. Choices NHS. Neurofibromatosis type 1 - NHS Choices [Internet]. 2013 [citován 13. březen 2014]. Dostupné z: <http://www.nhs.uk/Conditions/Neurofibromatosis/Pages/Introduction.aspx>
24. Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat*. 2000;15(6):541–55.
25. Carmen Valero M, Martín Y, Hernández-Imaz E, Marina Hernández A, Meleán G, María Valero A, et al. A Highly Sensitive Genetic Protocol to Detect NF1 Mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2011;13(2):113–22.
26. Přímá a nepřímá DNA diagnostika - ZDN [Internet]. [citován 10. duben 2014]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/prima-a-neprima-dna-diagnostika-145039>
27. Úvod do molekulární genetiky [Internet]. [citován 27. leden 2014]. Dostupné z: <http://www.gyn-test.cz/testy-uvod-do-molekularni-genetiky/>
28. Kočárek Eduard. Molekulární biologie v medicíně. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007 218 p. ISBN 978-807-0134-504.
29. UČEBNICE BIOCHEMIE [Internet]. [citován 23. leden 2014]. Dostupné z: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa7.htm>

30. Toliat MR, Erdogan F, Gewies A, Fahsold R, Buske A, Tinschert S, et al. Analysis of the NF1 gene by temperature gradient gel electrophoresis reveals a high incidence of mutations in exon 4b. *ELECTROPHORESIS*. 2000;21(3):541–4.
31. Manning M, Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med*. 2010;12(11):742–5.
32. Han SS, Cooper DN, Upadhyaya MN. Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Genet*. 2001;109(5):487–97.
33. Griffiths S, Thompson P, Frayling I, Upadhyaya M. Molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: 2 years experience. *Fam Cancer*. 2007;6(1):21–34.
34. DNA/Southern Blotting Protocols [Internet]. [citován 23. leden 2014]. Dostupné z: http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/DNA/Southern_Blotting/
35. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*. 1997;245(2):154–60.
36. Dymerska D, Serrano-Fernández P, Trubicka J, Masojć B, Kurzawski G. Analizy molekularne DNA i RNA w wykrywaniu dziedzicznych predyspozycji do nowotworów. *Postępy Nauk Medycznych* [Internet]. 30. červen 2010 [citován 22. duben 2014]; Dostupné z: <http://www.czytelniamedyczna.pl/3423,dna-and-rna-analyses-in-detection-of-genetic-predisposition-to-cancer.html>
37. Pospišilová Š., Tichý B., Mayer J. Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace aneb budeme rutinně sekvenovat lidské genomy? *Časopis lékařů českých*. 2009; 148 (7): 296–302.
38. Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kückceylan N, et al. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet*. březen 2000;66(3):790–818.
39. Froňková E. Sekvenování nové generace. *Čes-slov Patol.*, 49, 2013, No. 3, p.129–32.
40. MRC-Holland - MLPA Technology - MLPA an introduction [Internet]. [citován 13. listopad 2013]. Dostupné z: <http://www.mrc-holland.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVI/tHJIM\fa9FWO8KMqctOGIoqYwxaGF9Y>
41. Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De Raedt T, et al. Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2006;45(3):265–76.
42. Upadhyaya M, Spurlock G, Majounie E, Griffiths S, Forrester N, Baser M, et al. The heterogeneous nature of germline mutations in NF1 patients with malignant peripheral nerve sheath tumours (MPNSTs). *Hum Mutat*. 2006;27(7):716.

43. Muram-Zborovski TM, Vaughn CP, Viskochil DH, Hanson H, Mao R, Stevenson DA. NF1 exon 22 analysis of individuals with the clinical diagnosis of neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(8):1973–8.

7. PŘÍLOHY

Table 1a. SALSA MLPA P081-B2 NF1 probemix-1

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position reference NF1
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA	
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	
100	X-fragment: Specific for the X chromosome	
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome	
130	Reference probe 00797-L00463	5q31
136	Reference probe 00662-L00158	6p21
142	NF1 probe 02491-L01922	Exon 1
148	NF1 probe 02511-L03705	Exon 28 (22)
154	NF1 probe 05220-L03309	Exon 57 (48)
160	NF1 probe 02493-L01924	Exon 2
166	NF1 probe 02513-L01944	Exon 32 (24)
172	Reference probe 02797-L06029	3p24
178	NF1 probe 02865-L02617	Exon 4 (4A)
184	NF1 probe 02515-L01946	Exon 35 (27A)
193	Reference probe 01567-L01139	22q12 (NF2 gene, exon 4)
203	NF1 probe 02497-L03706	Exon 6 (4C)
212	NF1 probe 02517-L01948	Exon 37 (28)
220	Reference probe 01602-L01184	13q13
229	NF1 probe 13221-L12870	Exon 11 (9)
238	NF1 probe 02519-L01950	Exon 39 (30)
247	NF1 probe 03849-L03300	Exon 26 (20)
265	NF1 probe 02521-L01952	Exon 41 (32)
283	NF1 probe 02503-L03707	Exon 13 (10B)
292	NF1 probe 04071-L03708	Exon 47 (38)
300	Reference probe 01575-L01147	22q12 (NF2 gene, exon 12)
307	NF1 probe 04076-L03288	Exon 15a (11)
319	NF1 probe 02525-L01956	Exon 49 (40)
328	Reference probe 01918-L01462	1q22
337	NF1 probe 02507-L01938	Exon 17 (12B)
346	NF1 probe 02526-L01957	Exon 50 (41)
355	Reference probe 00965-L00552	2p13
364	NF1 probe 02509-L01940	Exon 21 (16)
373	NF1 probe 02528-L01959	Exon 52 (43)
382	Reference probe 02305-L01796	16q23
391	NF1 probe 02530-L01961	Exon 58 (49)
400	NF1 probe 04072-L03709	Exon 29 (23-1)
418	NF1 probe 12024-L12872	Exon 18 (13)
427	NF1 probe 03853-L03304	Exon 42 (33)
436	Reference probe 02891-L02359	1p36
445	NF1 probe 12026-L12874	Exon 23 (18)
454	OMG probe 04075-L03310	NF1 intron 36 (27B)
463	Reference probe 02674-L02141	11q23

Obrázek 1 SALSA MLPA P081-B2 NF1 probemix-1 (40)

Table 1b. SALSA MLPA P082-B2 NF1 probemix-2

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position reference	NF1
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	Reference probe 00797-L00463	5q31	
136	Reference probe 00662-L00158	6p21	
141	NF1 probe 03843-L03316		Exon 1
147	NF1 probe 02512-L01943		Exon 30 (23-2)
154	NF1 probe 12018-L12866		Exon 53 (44)
160	NF1 probe 02494-L01925		Exon 3
166	NF1 probe 02514-L01945		Exon 34 (26)
172	Reference probe 02797-L06029	3p24	
178 ¥	NF1 probe 02496-L01927		Exon 5 (4B)
184	NF1 probe 02516-L01947		Exon 36 (27B)
190	NF1 probe 12019-L12867		Exon 1
202	NF1 probe 02498-L01929		Exon 8 (6)
211	NF1 probe 02518-L01949		Exon 38 (29)
219	Reference probe 11520-L12262	17q25	
229	NF1 probe 02500-L01931		Exon 10 (8)
238	NF1 probe 02520-L01951		Exon 40 (31)
247	NF1 probe 12021-L14688		Exon 44 (35)
256	NF1 probe 03778-L03287		Exon 12 (10A)
265	NF1 probe 02522-L01953		Exon 46 (37)
272	Reference probe 06346-L05861	1p21	
283	NF1 probe 02504-L01935		Exon 14 (10C)
292	NF1 probe 02524-L01955		Exon 48 (39)
300	Reference probe 11523-L12265	19q13	
310	NF1 probe 02506-L02619		Exon 16 (12A)
319	NF1 probe 13217-L14550		Exon 51 (42)
328	Reference probe 10057-L10481	8q22	
335	NF1 probe 02508-L02620		Exon 20 (15)
346	NF1 probe 02529-L01960		Exon 55 (46)
355	Reference probe 00965-L00552	2p13	
364	NF1 probe 02510-L01941		Exon 25 (19B)
373	Reference probe 11275-L11958	7q32	
382	Reference probe 01839-L01404	16p13	
389	NF1 probe 04066-L03303		Exon 33 (25)
400	NF1 probe 12023-L12871		Exon 27 (21)
409	Reference probe 02669-L02136	11q23	
418	NF1 probe 03854-L03305		Exon 43 (34)
427	NF1 probe 12025-L14689		Exon 19 (14)
433	Reference probe 01057-L00630	17q12	
444	OMG probe 04069-L03311		NF1 intron 36 (27B)
454	NF1 probe 03856-L03307		Exon 45 (36)
463	Reference probe 05413-L04823	12p11	

Obrázek 2 SALSA MLPA P082-B2 NF1 probemix-2 (40)

Table 1. SALSA MLPA P122-C2 NF1 AREA probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		reference	NF1 NF1 area genes
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
124 ±	TRAF4 probe 09176-L09350		2348 kb upstream of NF1
130	Reference probe 00797-L00463	5q31	
136	Reference probe 00662-L00158	6p21	
142	NF1 probe 02491-L01922		Exon 1
147	NF1 probe 02512-L01943		Exon 30
154	NF1 probe 05220-L03309		Exon 57
160 *	Reference probe 17436-L21192	16p13	
166	PSMD11 probe 09632-L09917		1086 kb downstream of NF1
175	CRLF3 probe 03780-L03289		298 kb upstream of NF1
184	SUZ12 probe 03786-L03295		628 kb downstream of NF1
190	SUZ12P probe 11798-L12590		363 kb upstream of NF1
196	CPD probe 09629-L09914		632 kb upstream of NF1
202	Reference probe 03007-L02447	9q34	
208	SUZ12P probe 11801-L12592		336 kb upstream of NF1
214	BLMH probe 09626-L09911		803 kb upstream of NF1
220 ±	RNF135 probe 03783-L03292		110 kb upstream of NF1
226	CPD probe 09628-L09913		651 kb upstream of NF1
232	SSH2 probe 09635-L09920		1458 kb upstream of NF1
238	Reference probe 03532-L02898	7q36	
247	ATAD5 probe 03781-L03290		260 kb upstream of NF1
256 ±	UTP6 probe 03785-L03294		515 kb downstream of NF1
265	ASPA probe 01325-L07456		23001 kb upstream of NF1
274 *	Reference probe 02470-L01914	15q21	
283	PMP22 probe 01463-L00928		11243 kb upstream of NF1
292	ADAP2 probe 03782-L03291		168 kb upstream of NF1
301	LRRC37B probe 03787-L03296		648 kb downstream of NF1
310 *	Reference probe 01789-L01353	13q14	
319	NF1 probe 02525-L01956		Exon 49
328	MYO1D probe 09630-L09915		1420 kb downstream of NF1
337	NF1 probe 02507-L01938		Exon 17
346	Reference probe 01232-L00780	10p14	
355 ±	PSMD11 probe 09633-L09918		1108 kb downstream of NF1
362	ZNF207 probe 09637-L09949		1006 kb downstream of NF1
373	BLMH probe 09627-L09912		822 kb upstream of NF1
382	TRAF4 probe 08620-L08632		2347 kb upstream of NF1
391	MYO1D probe 09631-L09916		1407 kb downstream of NF1
400	SSH2 probe 09634-L09919		1399 kb upstream of NF1
409	Reference probe 04683-L04061	1p36	

Obrázek 3 SALSA MLPA P122-C2 NF1 AREA probemix (40)