

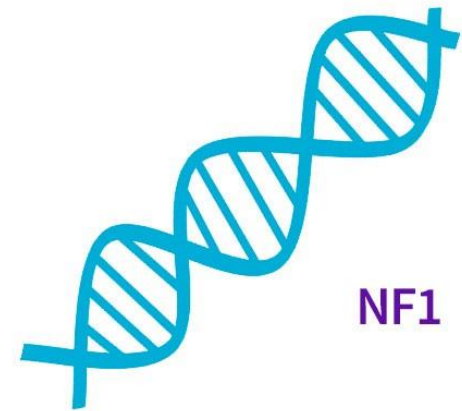
Podłoże molekularne neurofibromatozy typu I – możliwości diagnostyczne

Anna Abramowicz

Zakład Genetyki Medycznej

Instytut Matki i Dziecka

Nerwiakowłókniakowość typu I (NF1)



- Neurofibromatoza typu 1 lub Choroba von Recklinghausena
- OMIM 162200
- Choroba wieloukładowa, zaliczana do chorób z grupy: RASopatii oraz fakomatoz czyli chorób nerwowo-skórnych (ang. neurocutaneous syndromes)
- Dziedziczenie: autosomalne dominujące
- Częstość występowania 1/3000
- Średnia długość życia pacjentów 62 lata

Objawy

- **Plamy w kolorze kawy z mlekiem**
(cafe- au- lait, ok. 100% pacjentów)
- **Obustronne nakrapianie pach i pachwin** (70% pacjentów)



Objawy

Nerwiakowłókniaki (~95% pacjentów)

- Wzdłuż lub na obwodach zakończeń nerwowych z komórek osłonek nerwów obwodowych
- Różnią się wielkością (od mm do cm) oraz liczbą (od kilku do kilku tysięcy)



- **Nerwiakowłókniaki skórne**

- Lokalizacja podskórna
- Brak progresji do nowotworów złośliwych

- **Nerwiakowłókniaki splotowe**

- Lokalizacja na połączeniach nerwów
- Intensywny wzrost
- U 2% pacjentów mogą ulegać progresji do nowotworów złośliwych MPNST-Złośliwy nowotwór osłonek nerwów obwodowych (ang. malignant peripheral nerve sheath tumor)



Objawy

- **Guzki Lisha**
 - Hamartoma tęczówki
 - ~90% dorosłych pacjentów
- **Nowotwory OUN (15-20% pacjentów)**
 - Głównie glejaki nerwu wzrokowego
 - Nerwiakowłókniaki rdzeniowe
- **Zmiany kostne (10-26% pacjentów)**
 - Dysplazja kości klinowej oraz kości długich
 - Skolioza
 - Staw rzekomy kości piszczelowej
 - Makrocefalia
 - Niskorosłość



Objawy

- Zaburzenia neurologiczne (30-60%)
 - Problemy szkolne wynikające z niewłaściwego widzenia przestrzennego, słabej koordynacji, osłabienia uwagi oraz problemów z planowaniem i organizacją
 - Problemy logopedyczne
 - Problemy z artykulacją oraz zaburzenia dotyczące formowania zdań
 - Nieprecyzyjna ekspresja werbalna, zmniejszony poziom komunikatywności oraz utrudniony interpersonalny kontakt
- Zaburzenia układu krążenia i hematopoetycznego (1%)
 - Nadmierna proliferacja komórek śródbłonna- zwężenie naczyń krwionośnych
 - Zwiększone ryzyko wystąpienia nadciśnienia, udaru mózgu i choroby wieńcowej
 - Młodzięcza białaczka mielomonocytowa



Jakość życia pacjentów z NF1

- Problemy „kosmetyczne”
- Bardzo zmienny i trudny do przewidzenia obraz kliniczny choroby
- Główne problemy podczas dzieciństwa:
 - Zmiany ortopedyczne
 - Problemy z nauką
 - Nerwiakowłókniaki splotowe
- Główne problemy w dorosłym życiu
 - Wygląd
 - Nerwiakowłókniaki splotowe, inne nowotwory

Kryteria diagnostyczne

Kryteria diagnostyczne National Institutes of Health (NIH)

6 lub więcej plam przebarwieniowych typu CAL o średnicy 5 mm przed okresem dojrzewania lub 15 mm po tym okresie

Dwa lub więcej nerwiakówłókniaki skórne lub jeden nerwiakówłókniak splotowy

Piegowate nakrapianie okolic pach i pachwin

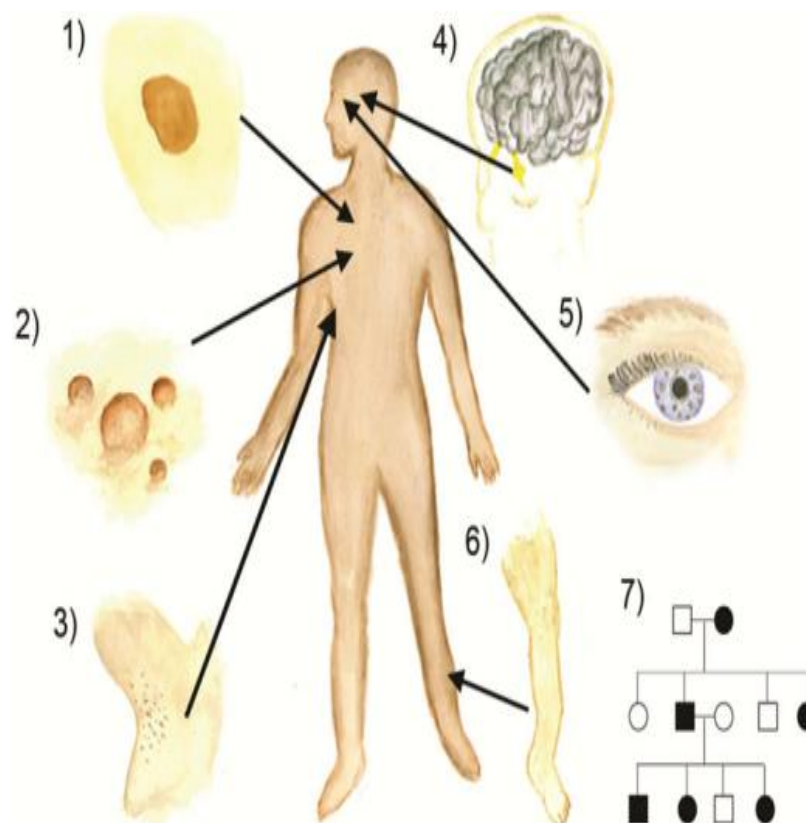
Glejak nerwu wzrokowego

2 lub więcej guzki Lischa (hamartoma tęczówki)

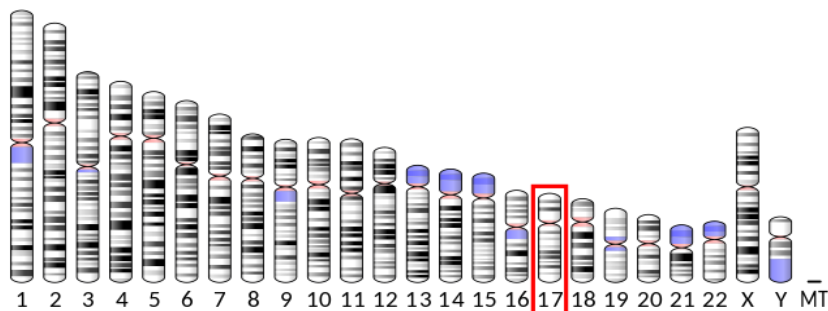
Charakterystyczne zmiany kostne (skrzywienie kości długich, obecność stawu rzekomego, dysplazja kości klinowej)

Krewny (rodzic) pierwszego stopnia chory na NF1

Obecność patogennego wariantu w genie *NF1*



Patogeneza



Chromosom: 17 (17q11.2),

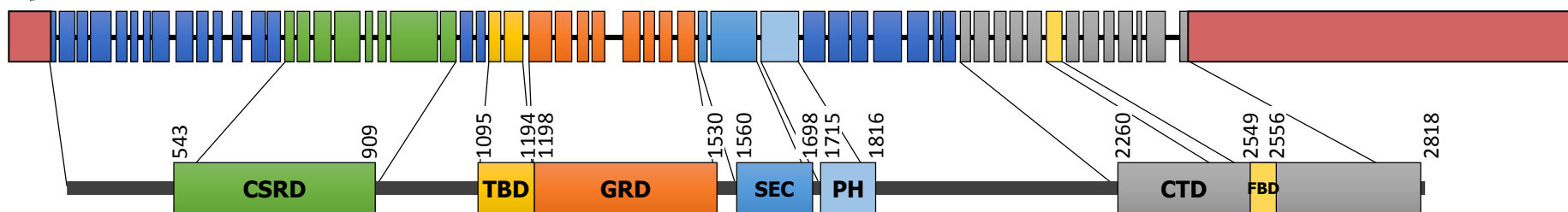
Gen: *NF1*, około 280 kpz, 57 eksonów

Transkrypt: NM_000267, 8457 pz

Produkt: neurofibromina, 2818 aminokwasów



NF1 mRNA – izoforma I



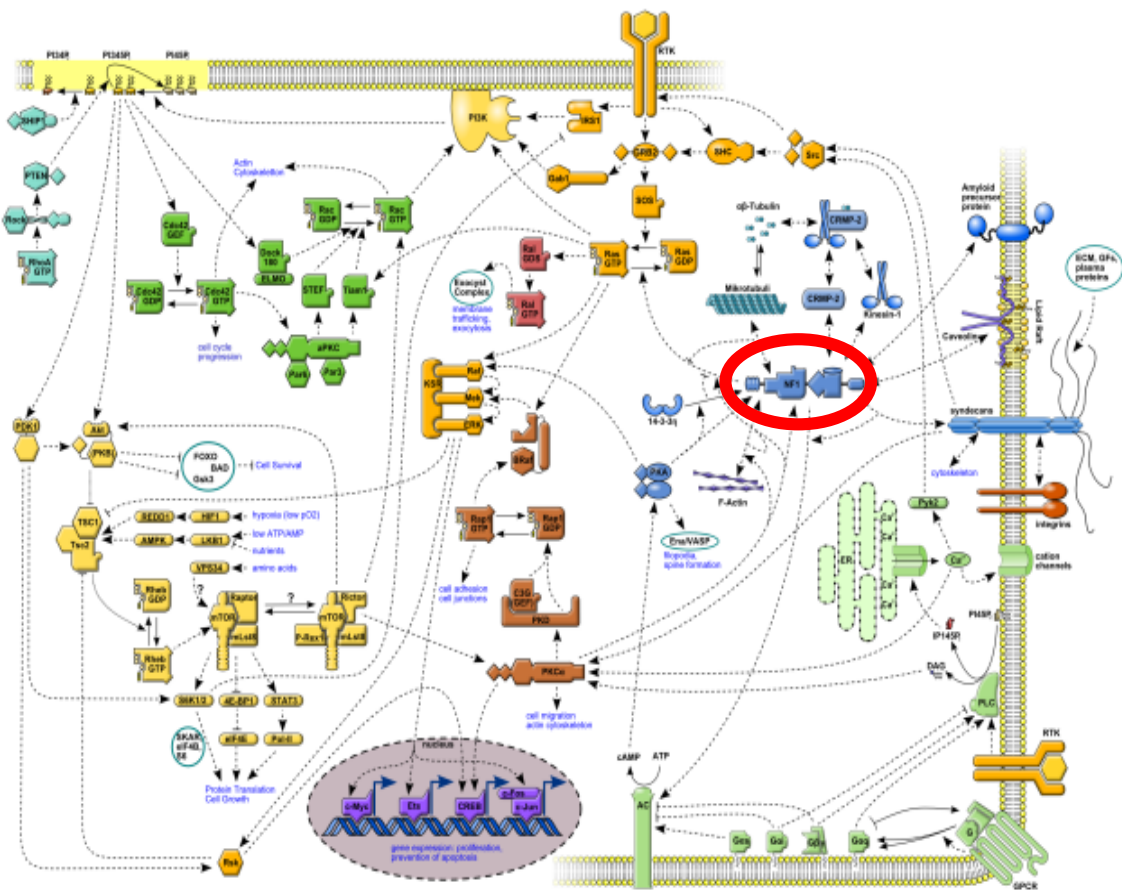
Neurofibromina

Patogeneza

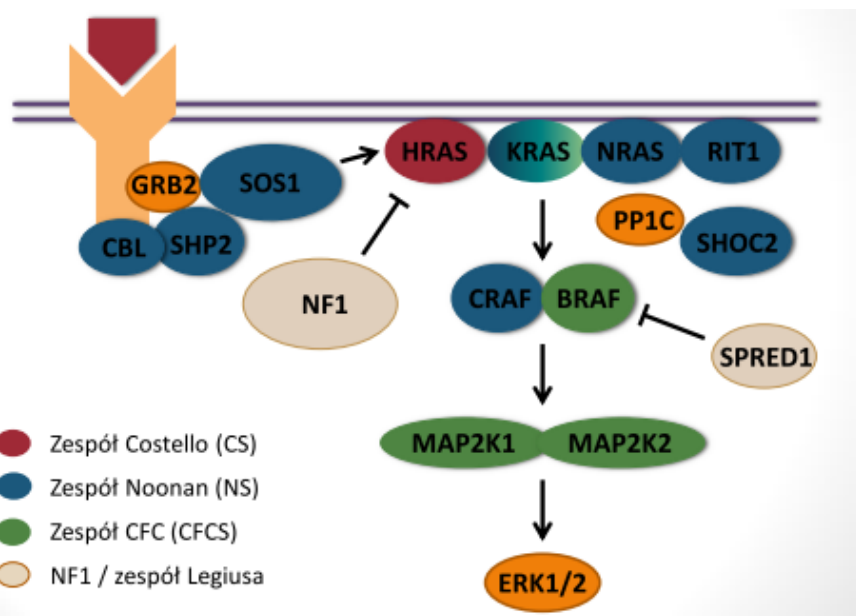
Szlaki sygnałowe:

- RAS/MAPK
- PI3K/AKT/mTOR
- cAMP/PKA
- Rearanżacje cytoszkieletu
- Regulacja transportu wewnątrzkomórkowego

→ objawy ze strony różnych układów



Patogeneza- szlak RAS/MAPK



za Monika Gos

Patogeneza- szlak RAS/MAPK



za Monika Gos

Genetyka NF1

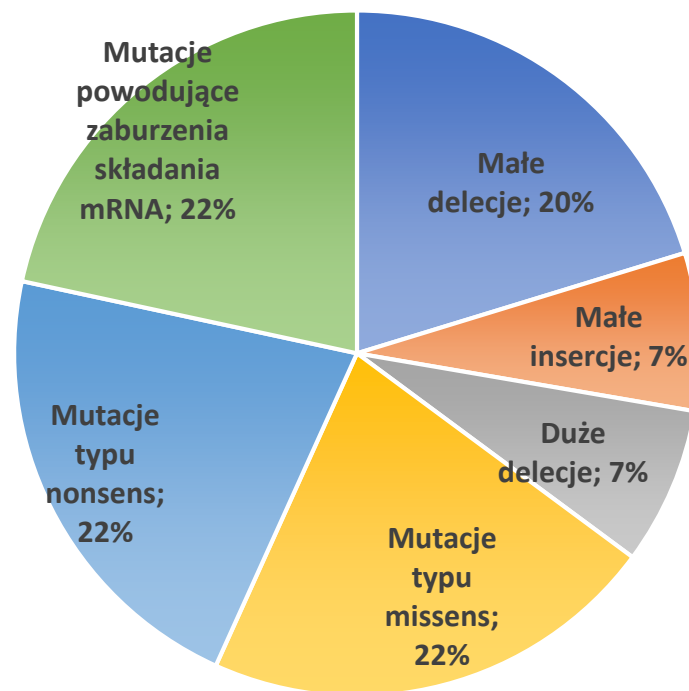
- Monogenowa, dziedziczona w sposób autosomalny dominujący
- 50% wykrywanych mutacji w genie *NF1* ma charakter *de novo*
- Mutacje:
 - Posiadają 100% penetrację
 - Wykazują efekt plejotropowy
- Heterogenność kliniczna
- Występowanie objawów zależne od wieku pacjenta
- Różnorodność objawów, nieprzewidywalna ewolucja objawów choroby, niepewne rokowania



Mutacje w genie *NF1*

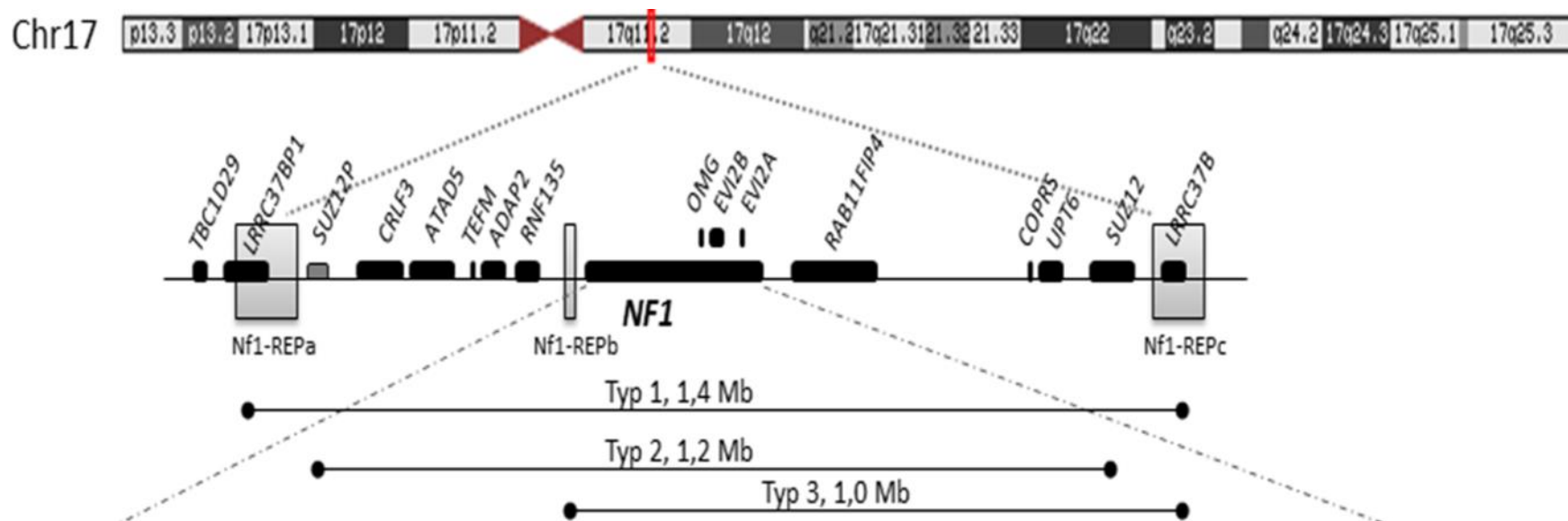
- **90% przypadków** – mutacje punktowe (HGMD: 2711); większość ($\approx 80\%$) skutkuje powstaniem skróconej postaci białka; losowe rozmieszczenie w genie *NF1*

Typ mutacji	Liczba mutacji
Małe delecje	30
Małe insercje	11
Duże delecje	11
Mutacje typu missens	32
Mutacje typu nonsens	32
Mutacje powodujące zaburzenia składania mRNA	32
Suma	148



Mutacje w genie *NF1*

- **5-7% przypadków** - delecje genu *NF1* (jednoeksonowe, wieloeksonowe, gen *NF1* + regiony sąsiadujące)

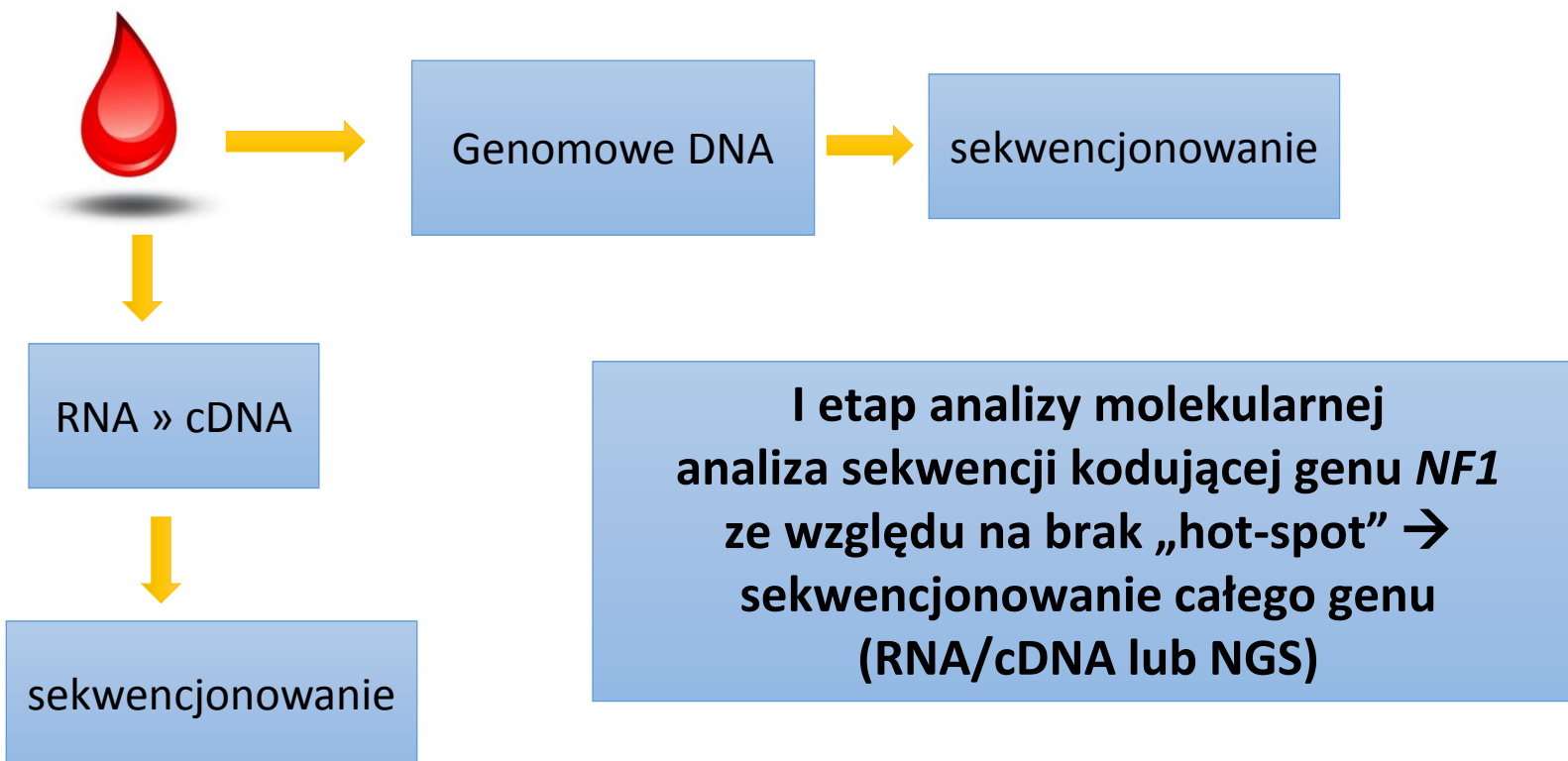


Dlaczego powinno się wykonać diagnostykę molekularną?

- potwierdzenie rozpoznania klinicznego - prawidłowa diagnoza
- dla celów poradnictwa genetycznego
- dla celów prognostycznych (prognozowanie przebiegu choroby)
- dla celów terapeutycznych



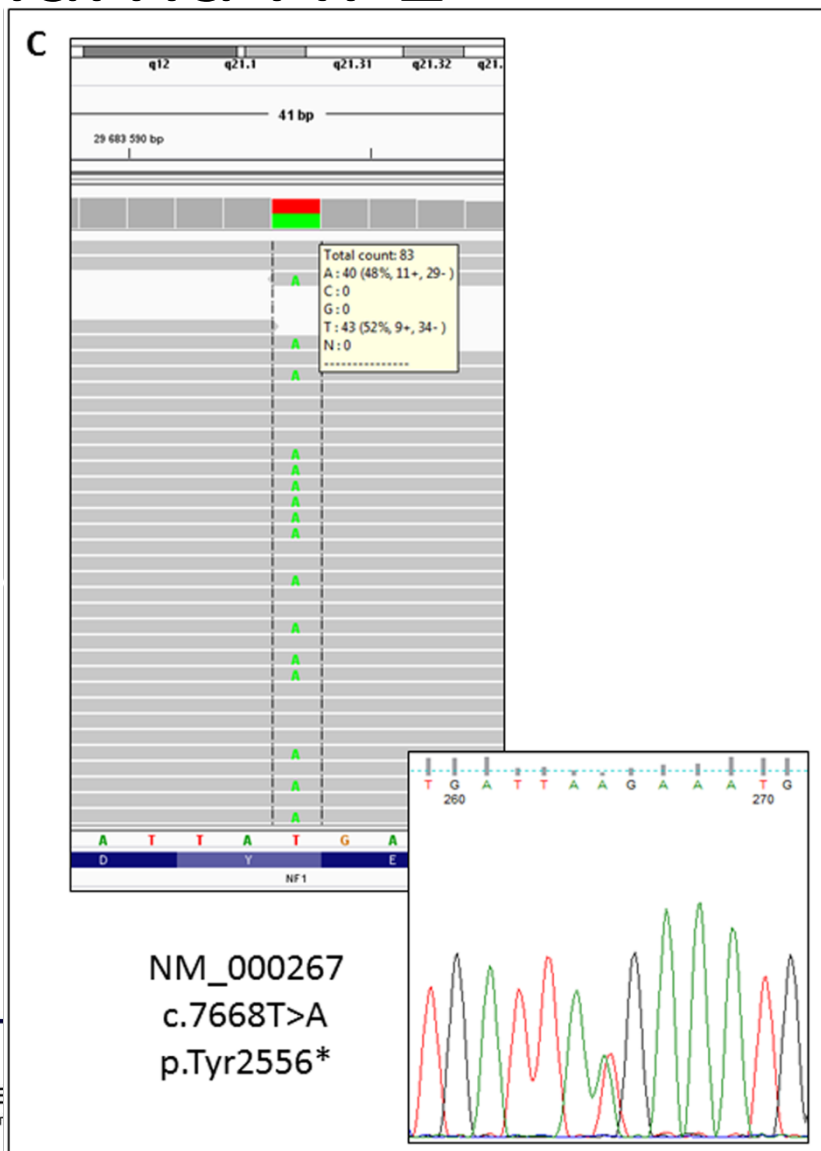
Diagnostyka molekularna NF1



Diagnostyka molekularna NF1

Analiza genomowego DNA

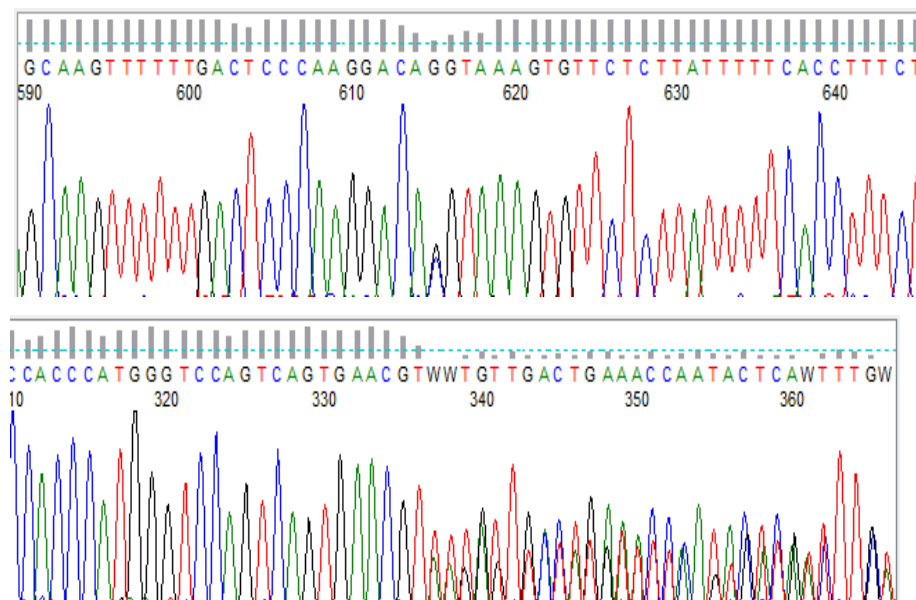
- Sekwencjonowanie klasyczną metodą Sanger
 - Długi proces analizy- duża liczba amplikonów
- Sekwencjonowanie następnej generacji
 - Jednoczesna analiza wszystkich eksonów genu *NF1*
- W obu przypadkach brak możliwości bezpośredniej identyfikacji zmian odpowiedzialnych za zaburzenia składania mRNA → konieczność analizy *in silico* z wykorzystaniem pakietów komputerowych



Diagnostyka molekularna NF1

Analiza mRNA

- Sekwencjonowanie mRNA/cDNA genu *NF1*
 - Wymaga dodatkowego etapu odwrotnej transkrypcji, czyli syntezy cDNA na matrycy RNA
 - Szybsza analiza sekwencji *NF1*
 - Mniejsza liczba ampikonów niż w przypadku DNA genomowego
 - Umożliwia wykrycie mutacji zaburzających składanie mRNA
 - Następstwem powinno być potwierdzenie zmiany w genomowym DNA, co znacznie ułatwia ewentualne badanie nosicielstwa mutacji w rodzinie probanta
 - Zastosowanie tej metody umożliwia wykrycie mutacji u około 90% pacjentów z rozpoznaniem klinicznym NF1



- Analiza gDNA
 - Wariant c.2850G>C w eksonie 21
 - p. Gln950His?
- Analiza RNA/cDNA
 - r. 2618_2850del
 - Delecja 233pz eksonu 21
 - **p. Lys874Phefs*3**

Diagnostyka molekularna NF1

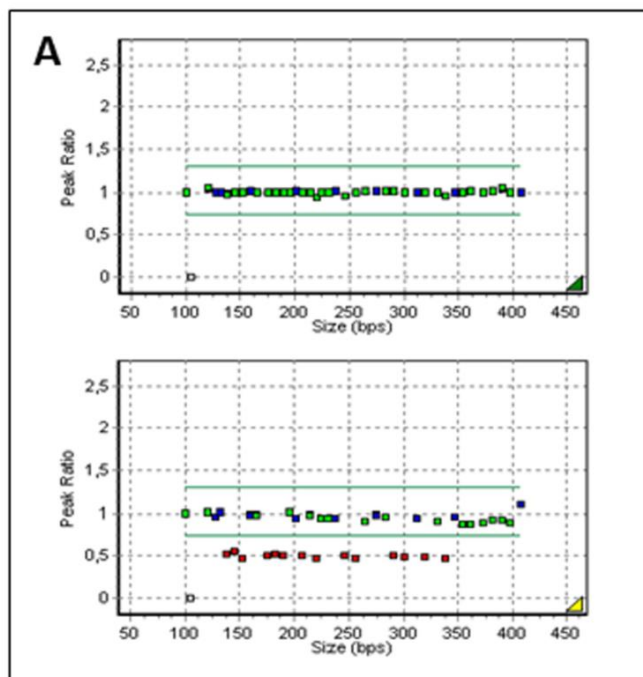
	Genomowy DNA		RNA/cDNA
	Sekwencjonowanie met. Sangera	NGS	Sekwencjonowanie met. Sangera
Obecność pseudogenów <i>NF1</i>	Obecne	Obecne	Brak
Ilość analiz	Analiza 57 eksonów po kolei	Jednoczesna analiza wszystkich eksonów genu <i>NF1</i>	Analiza 3 lub 5 amplikonów
Dodatkowe wymagania	Brak	Wymaga przygotowania bibliotek	<u>Uzyskanie świeżej próbki krwi</u> założenie hodowli w ciągu 24 godzin
Bezpośrednia identyfikacja zmian odpowiedzialnych za zaburzenia składania mRNA	Brak możliwości	Brak możliwości	Umożliwia identyfikację głębokointronowych wariantów

Diagnostyka molekularna NF1

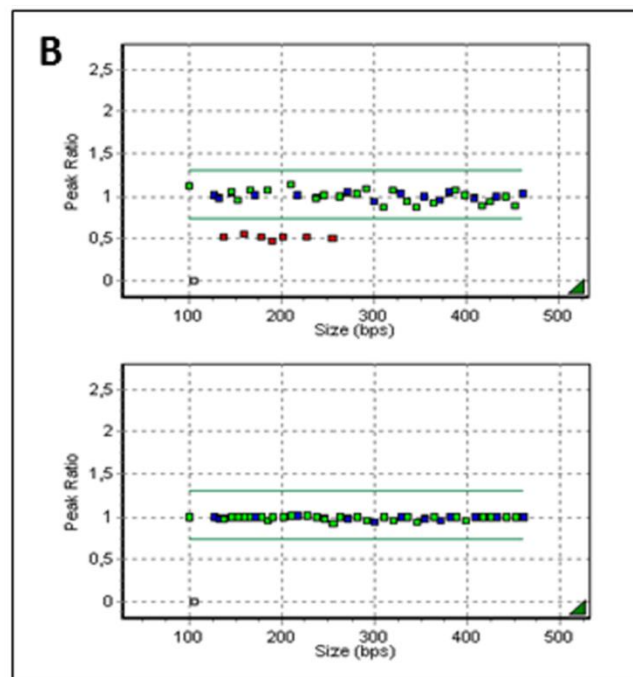
**II etap analizy molekularnej w przypadku
wykluczenia obecności mutacji punktowej
Badania pod kątem delecji fragmentu lub
całego genu *NF1***

- Multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji (ang. multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA)
 - Ilościowa ocena badanych fragmentów DNA
 - Wykrycie delecji lub duplikacji
 - Identyfikacja delecji pojedynczych eksonów

Diagnostyka molekularna NF1



Zestaw P122 zawierający sondy dla genu *NF1* oraz innych z regionu 17q11.2

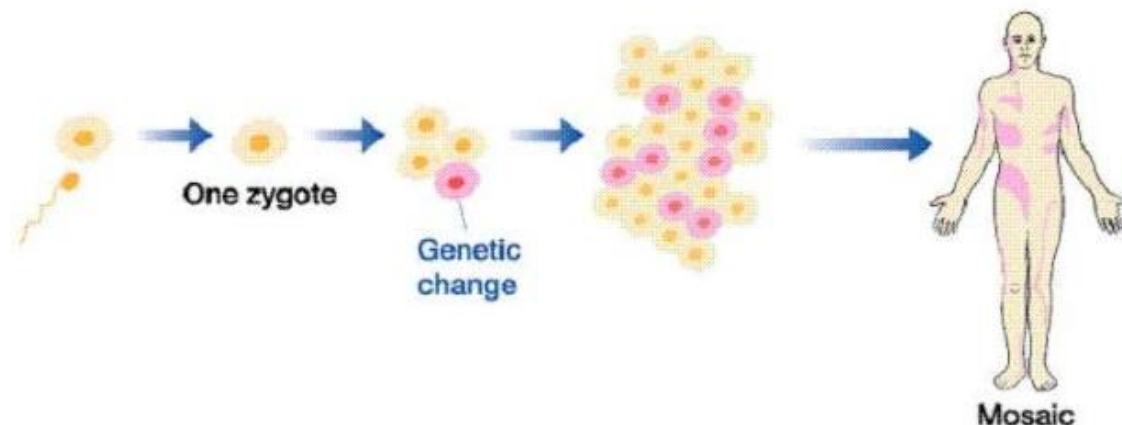


Zestawy P081/P082 zawierają sondy dla wszystkich eksonów genu *NF1*.

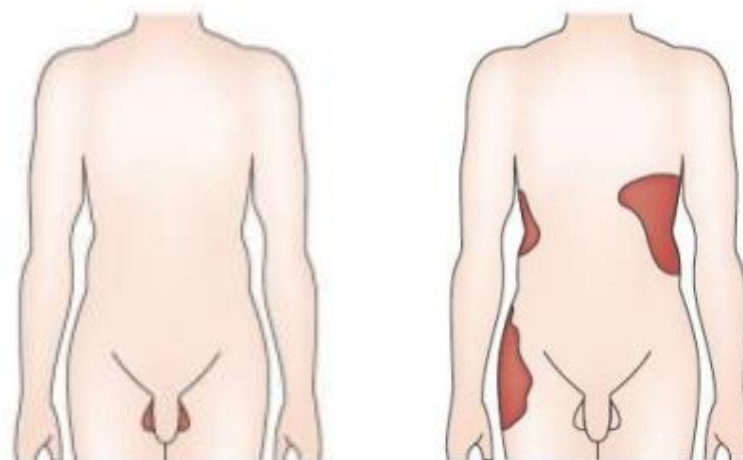
Różnicowanie

- Inne rodzaje neurofibromatoz
 - Segmentalna/mozaikowość NF1
 - Z. rodzinie występujących mnogich CAL
 - Nerwiakowłóknikowość zespół Noonan (NF/NS)
 - Zespół Legiusa (NF1LS)
- Oraz inne choroby z plamami CAL lub guzami typu schwannoma
 - Nerwiakowłóknikowości typu 2 (NF2)
 - Schwannomatoza (*LZTR1*, *SMARCB1*)
 - Z. Noonan z plamami soczewicowatymi (dawniej z.LEOPARD)
 - Z. McCune–Albright
 - Z. konstytutywnego niedoboru naprawy DNA typu „mismatch repair” (CMMRDS; zespół Turcota)
 - Melanoza skórno-nerwowa
 - Z. Peutz–Jeghers
 - Piebaldyzm
 - Z. Klippel–Trenaunay–Weber
 - Z. Proteus
 - Anemia Fanconiego

Mozaikowość



- Powstanie mutacji w genie *NF1* w okresie postzygotycznym - współwystępowanie w jednym organizmie różnych pod względem genetycznym linii komórkowych
- Formy mozaikowości :
 - Uogólniona - mutacje somatyczne, wystąpiły na wczesnym etapie w czasie rozwoju embrionalnego, łagodniejsza postać choroby
 - Segmentowa - mutacje somatyczne powstały na etapie późniejszego stadium rozwoju embrionalnego, objawy kliniczne ograniczone są do jednej części ciała
 - Gonadalna - mutacja jest obecna tylko w komórkach linii płciowej, brak występowania objawów klinicznych, zdrowi rodzice posiadają dzieci (>2) z rozpoznaniem NF1



Nerwiakowłókniakowość- zespół Noonan

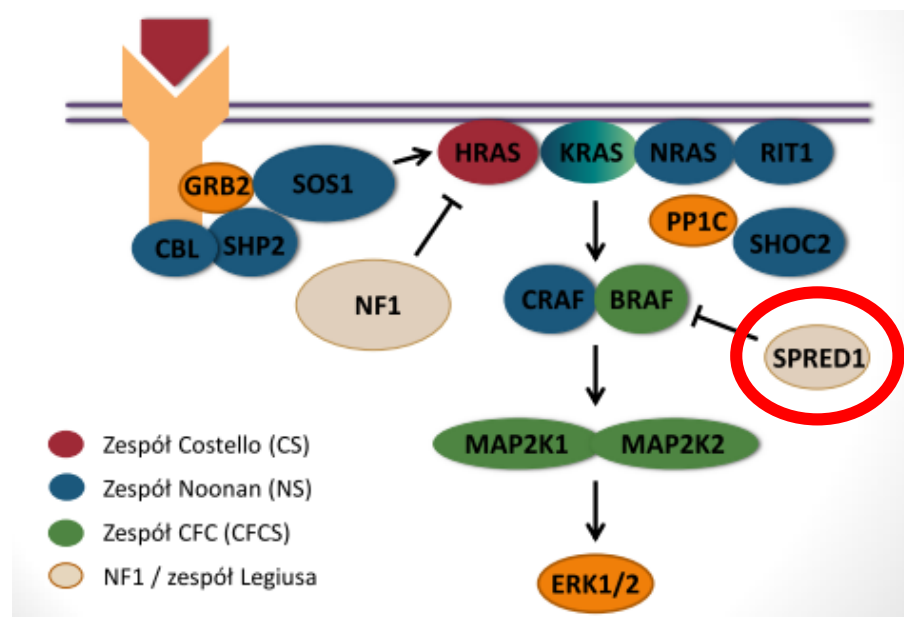
- NFNS, OMIM 601321
- Podjednostka kliniczna (RASopatie)
- Pacjenci wykazują:
 - Charakterystyczne cechy kliniczne zespołu Noonan takie jak: hiperteloryzm, skośne ułożenie szpar powiekowych, nisko osadzone uszy, płetwista szyja czy zwężenie zastawki tętnicy płucnej
 - Charakterystyczne cechy kliniczne NF1: plamy CAL i inne zmiany skórne
- Mutacje w genie *NF1*
- Sugeruje się, że specyficzny fenotyp może wynikać z:
 - Określonej lokalizacji mutacji w genie *NF1*
 - Zaburzeń oddziaływania neurofibrominy z białkiem RAS (mutacje typu missens)



NF1: c.5425C>T
(p.Arg1809Cys)

Zespół Legiusa (LS; NFLS)

- Bardzo rzadki, dziedziczenie autosomalne dominujące
- Objawy:
 - Liczne plamy cafe au lait (CALS)
 - Piegowatość pach i/lub pachwin
 - Brak pozostałych cech klinicznych NF1 (w tym nerwiakowłókniaków i innych guzów)
- Mutacje w genie *SPRED1*
- Białko SPRED1 bierze udział w regulacji szlaku transdukcji sygnału RAS-MAPK
- Ok. 48% pacjentów z LS spełnia kryteria kliniczne rozpoznania NF1
- Ok. 2% chorych z rozpoznaniem NF1 ma zespół Legiusa



Dziękuję za uwagę!



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



edu-metgen.imid.med.pl