proLékaře.cz | 6.11.2026

Tuberózní skleróza: optimalizace postupu její DNA diagnostiky

Tuberous Sclerosis: Optimisation of its DNA Diagnosing Procedure

Souhrn

Cílem práce je uvést klinickogenetické aspekty u tuberózní sklerózy, poukázat na přínos genetického testování i jeho limity a seznámit s optimalizovaným postupem při genetickém vyšetřování. Tuberózní skleróza je autozomálně dominantně dědičné neurokutánní onemocnění s extrémní variabilitou klinických projevů. Choroba je podmíněna mutací v jednom ze dvou tumorsupresorových genů, *TSC1* nebo *TSC2*. Bylo popsáno široké spektrum kauzálních mutací s náhodnou distribucí v zodpovědných genech. Navrhovaný postup vyšetření DNA byl vytvořen na základě zkušeností z analýzy 65 vzorků od českých pacientů a testováním 53 pozitivních kontrolních vzorků ze zahraničních partnerských pracovišť. Základními kritérii pro volbu nejvhodnějšího postupu pro DNA diagnostiku u TSC pacientů byla ekonomičnost, účinnost a kapacita laboratoře.

Abstract

The goal of the study is to inform about clinical and genetic aspects of tuberuos sclerosis, to point out the benefit of genetic testing as well as its limits, and to inform about the optimised genetic testing procedure. Tuberous sclerosis is an autosomally dominant hereditary neurocutaneous disease with extremely variable clinical manifestations. The disease results from mutation in one of the two tumour-suppressor genes, i.e. *TSC1* or *TSC2*. A wide range of causal mutations with random distribution in the responsible genes has been described. The proposed DNA examination procedure was designed on the basis of knowledge obtained from the analysis of 65 samples from Czech patients and by tests performed on 53 positive control samples from partner centres abroad. The basic criteria for the selection of the best procedure for DNA diagnosis in TSC patients was economy, efficiency and laboratory capacity.

R. Vrtěl[1], G. Voutsinas[2], R. Vodička[1], H. Filipová[1], P. Kotlárová[1], V. Smutná[1], D. Šimková[1], D. Konvalinka[1], A. Šantavá[1], J. Šantavý[1]

[1] Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, LF UP a FN Olomouc
[2] Laboratory of Environmental Mutagenesis and Carcinogenesis, Institute of Biology, NCSR "Demokritos", Aghia Paraskevi Attikis, Greece

✉ Mgr. Radek Vodička, Ph.D.
Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny
LF UP a FN
I. P. Pavlova 6
775 21 Olomouc
e-mail: vodickar@fnol.cz

Přijato k recenzi: 17. 4. 2008
Přijato do tisku: 7. 5. 2008

Klíčová slova

tuberózní skleróza – tumorsupresorový gen – mutační skríning – sekvenační analýza – epilepsie – psychomotorická retardace

Key words

tuberous sclerosis – tumour-suppressor gene – mutation screening – sequence analysis – epilepsy – psychomotor retardation

Zdroj podpory a poděkování: Práce byla řešena jako součást projektu MŠMT česko-řecké vědecko-technické spolupráce kontaktu č. 7-2006-20, ME 923. *TSC1* and *TSC2* genetic alterations in tuberous sclerosis (Genetické změny *TSC1* a *TSC2* u tuberózní sklerózy, 2006–2007).
Za radu a spolupráci děkujeme dr. D. Halley a dr. A. van Ouweland z pracoviště Klinické genetiky Erasmovy Univerzity Rotterdam, Holandsko.

proLékaře.cz | 6.11.2026

Tuberózní skleróza, též tzv. komplex tuberózní sklerózy (TSC), je neurokutánní onemocnění s autozomálně dominantním typem dědičnosti. Choroba je charakterizovaná vznikem hamartomů a hamarcií postihujících četné orgánové systémy, nejčastěji kůži, mozek, ledviny, srdce a plíce. Postižen však může být prakticky jakýkoli orgánový systém. Pro klinickou diagnostiku byla pečlivě stanovena kritéria [1]. Výběr neurologických příznaků shrnuje tab. 1.

Onemocnění je klinicky velmi různorodé, projevuje se variabilitou symptomů a různou závažností postižení. Rozdílná exprese je pozorována nejen u pacientů z různých rodin, ale rovněž mezi postiženými příbuznými téže rodiny. Spektrum symptomů u různých pacientů se pohybuje od prakticky bezpříznakových kožních projevů až po těžké poškození CNS s epilepsií a psychomotorickou retardací [2].

V souvislosti s věkem jsou nejčastější příčinou úmrtí v novorozeneckém období rozsáhlé rhabdomyomy. V pozdějším věku může život ohrozit zejména epilepsie a komplikace spojené s přítomností subependymálních obrovskobuněčných astrocytomů (Subependymal Giant Cell Astrocytoma, SEGA). Postižení ledvin spolu s poškozením CNS mohou být příčinou mortality v adolescenci a dospělosti. V tomto období se jedná především o selhání ledvin, náhlé vnitřní krvácení z velkých hamartomů v ledvinách či mozku, vzácně i vznik renálního karcinomu. U žen ve věku 20 až 40 let může být fatální rovněž postižení plicní lymfangiomyomatózou (LAM) [3].

TSC bývá často odhalena právě na neurologickém pracovišti. Jedná se o selektivní záchyt pacientů s poruchou CNS, přičemž postižení CNS je většinou spojeno se závažnějšími a markantnějšími projevy TSC. Ovšem neurologické vyšetření nemusí vždy jednoznačně stanovit diagnózu TSC a je třeba je doplnit o další specializovaná vyšetření, zejména dermatologické, nefrologické a oftalmologické. Velmi důležitá je i konzultace na genetickém pracovišti, a to jak pro samotného pacienta, tak i pro stanovení rizika u jeho příbuzných. Při nejasné diagnóze u pacienta, případně u dalších rodinných příslušníků a zvláště při plánování rodičovství v takto postižené rodině je podstatné odhalit mutaci zodpovědnou za dané onemocnění.

Tab. 1. Neurologické symptomy TSC [1].

Majoritní znaky	– kortikální tuber[1] – subependymální noduly – subependymální obrovskobuněčné astrocytomy
Minoritní znaky	– cerebrální radiální migrační dráhy bílé hmoty[1]
Nespecifické znaky	– epileptické záchvaty[2] – infantilní křeče[2]

[1] vyskytne-li se současně cerebrální kortikální dysplázie a cerebrální migrační dráhy bílé hmoty, jsou počítány spíše jako jeden než jako dva znaky TSC
[2] nejsou zahrnovány mezi diagnostická kritéria, jsou však přítomny u 90 % TSC případů

Tab. 2. Spektrum mutací odhalených v genech *TSC1* a *TSC2* [6–13].
Mutace pozorované u *TSC1* (n = 174) a u *TSC2* (n = 1 038)

Typ mutace	% *TSC1* mutací	% *TSC2* mutací
malé delece a inzerce	45–59	20–32
nesmyslné mutace	33–45	18–24
záměnové mutace	0	20–27
sestřihové mutace	7–9	12–15
velké delece a přestavby	1–2	1–7

TSC je geneticky heterogenní onemocnění způsobené poruchou jednoho z tumorsupresorových genů se zodpovědnými lokusy ležícími na chromozomech 9q34 (gen *TSC1*) a 16p13.3 (gen *TSC2*).

Gen *TSC1* zaujímá v genomické DNA délku přibližně 50 kb a je tvořen 23 exony. Exony 1 a 2 nejsou při proteosyntéze překládány, a tak kódující oblast, dlouhou 3 492 pb, tvoří exony 3 až 23 [4]. Většinu poruch genu tvoří drobné (bodové) mutace vedoucí ke zkrácení kódovaného proteinu (tab. 2).

Gen *TSC2* zaujímá v genomické DNA rovněž délku kolem 50 kb, má 41 exonů o celkové délce 5 474 pb, exony č. 25 a 31 jsou alternativně sestřihovány [5]. Tento gen leží v sousedství s PKD1 genem, zodpovědným za polycystickou chorobu ledvin. V genu *TSC2* bylo identifikováno široké spektrum mutací včetně rozsáhlých přestaveb, velkých delecí a záměnových mutací (tab. 2).

Navržení optimální strategie diagnostiky TSC

Na našem pracovišti FN Olomouc se zabýváme vyhledáváním mutací u TSC pacientů již přes 10 let. Shrnutí konkrétních výsledků DNA analýzy je popsáno v tab. 3.

Na základě našich dosavadních zkušeností (tab. 3) a poznatků vycházejících z prací autorů uvedených v tab. 2 a ve spolupráci s holandskými a řeckými kolegy jsme postupně stanovili nejvhodnější postup pro DNA diagnostiku u tohoto onemocnění. Základními kritérii pro volbu postupu byla ekonomičnost, účinnost a kapacita pracoviště.

Skríningová metoda analýzy jednořetězcového konformačního polymorfizmu (SSCP) pro vyhledávání „bodových" mutací typu malých inzercí a delecí, nesmyslných, záměnových a sestřihových mutací byla nahrazena účinnější metodou denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE), (obr. 1). Namísto pracné a zdlouhavé Southernovy hybridizační techniky pro vyhledávání rozsáhlých přestaveb byla zavedena rychlejší a elegantnější metoda multiplexové ligačně-dependentní amplifikace prób (MLPA), (obr. 2).

proLékaře.cz | 6.11.2026

Tab. 3. Souhrn výsledků vyšetření u českých pacientů ke dni 1. 3. 2008.

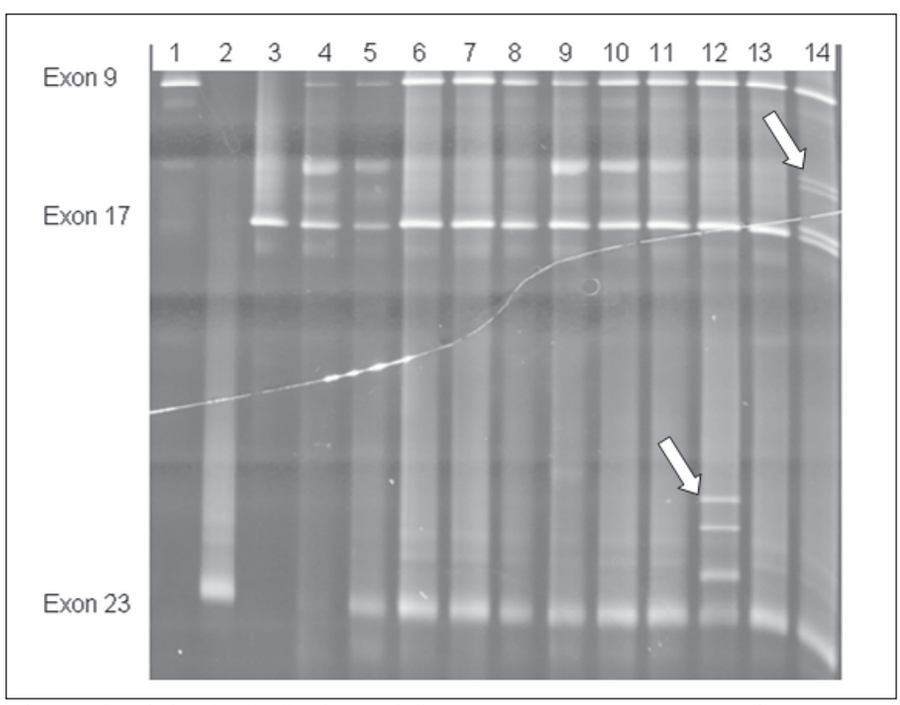
Skríningové metody pro bodové změny			Potvrzení mutace a přímá diagnostika			Prenatální diagnostika
DGGE	*TSC2* 32 exonů	65/25	sekvenace	*TSC2*	19/3	1 PGD
	TSC1 21 exonů	63/37		*TSC1*	25/3	3
SSCP	*TSC2* 22 exonů	65/6	dot blot	*TSC1*	23/14	
	TSC1 21 exonů	65/14				
Skríningové metody pro rozsáhlejší změny						
Southernova hybridizace	*TSC2*	40/1	Southernova hybridizace			1
MLPA	*TSC2*	63/4				
Testování vazby						
		počet rodin				
	TSC2	8/3				1
	TSC1	8/4				2
Testování LOH						
	TSC2	17/2				
	TSC1	17/1				

Čísla před lomítkem udávají počet vyšetření a údaje za lomítkem počty pozitivních nálezů

Spolehlivost metody MLPA byla ověřena na pozitivních vzorcích ze Southernovy hybridizace.

Metoda DGGE byla testována ve spolupráci s holandským pracovištěm, které poskytlo 14 pozitivních vzorků na mutace v různých exonech genu *TSC1* a 39 pozitivních vzorků na mutace v různých exonech genu *TSC2*. Metodou DGGE bylo možno jednoznačně rozpoznat změny u 51 vzorků. Účinnost naší metody dosahuje tedy 96 %.

Schopnost metody DGGE zachytit mozaiku byla posuzována s využitím artificiálních mozaik. U sledovaných mutací byla metodika schopna detekovat mutovanou alelu přibližně v 15% zastoupení.

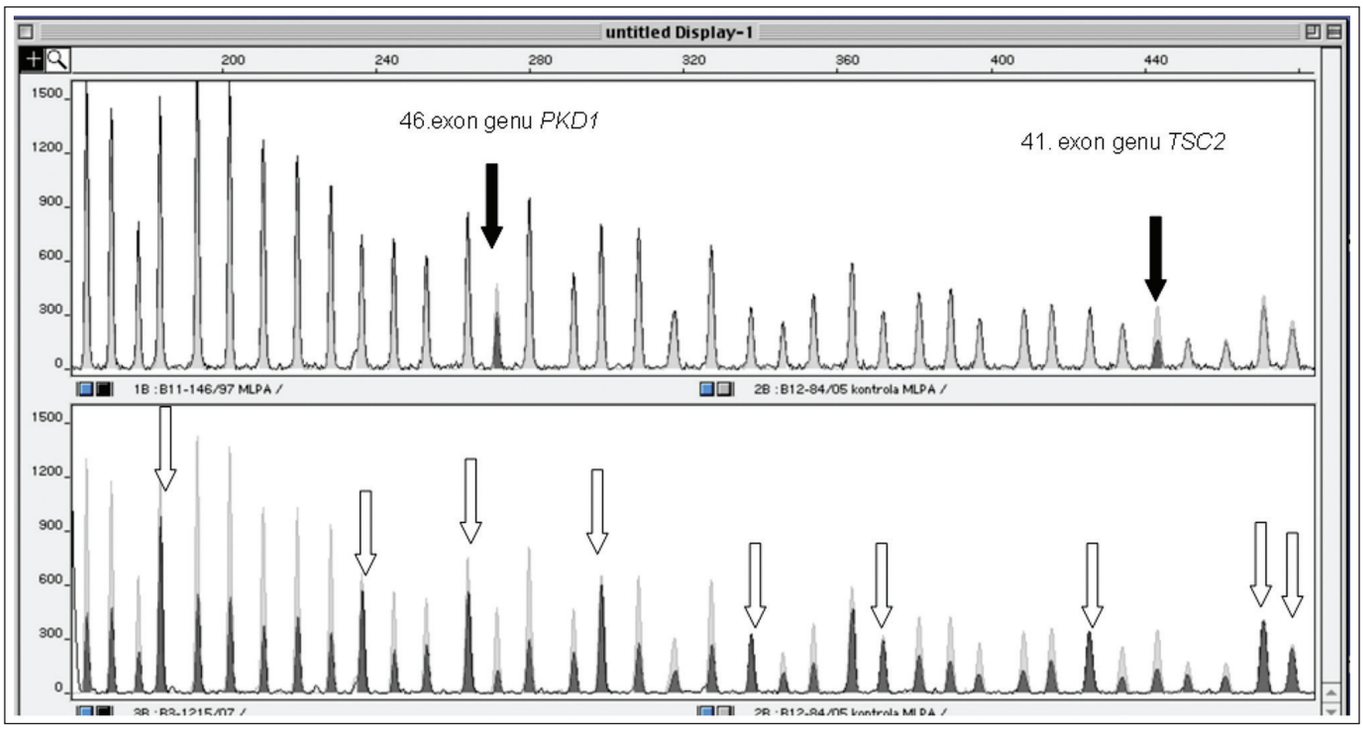


Obr. 1. Simultánní vyšetření exonů č. 9, 17 a 23 *TSC1* genu metodou DGGE.
Vzorky 1–3 fyziologické kontroly v jednotlivých exonech, 4–14 vzorky TSC pacientů; šipky označují záchyt mutace v exonu 23 u pacienta č. 12 a v exonu 17 u pacienta č. 14.

Nastavení optimálního vyšetřovacího postupu při vyhledávání kauzálních mutací:

1. zahájit skríning metodou DGGE. Na základě zkušeností z výskytu mutací při vyšetřování rozsáhlých souborů se doporučuje začít DGGE v případě genu *TSC2* exonem 16 a v případě *TSC1* exony 15 a 17
2. pozitivní nálezy DGGE skríningu průběžně sekvenovat
3. provést přímou sekvenaci 9 exonů genu *TSC2* (exony 1, 8, 13, 18, 24, 28, 31, 32 a 39) nevhodných pro DGGE
4. paralelně se skríningem bodových mutací podrobit vzorky MLPA analýze
5. pokud je to možné, otestovat vzorky na vazbu přilehlých markerů (krátkých

proLékaře.cz | 6.11.2026



Obr. 2. Detekce rozsáhlých delecí *TSC2* genu metodou MLPA.

Obrázek představuje výřez elektroforetogramu z kapilární elektroforézy. Černé peaky jsou PCR produkty DNA pacienta, šedé označují fyziologickou kontrolní DNA. V horní části: redukce signálu PCR produktu 46. exonu PKD1 a 41. exonu *TSC2* (šipky) ve srovnání s fyziologickou kontrolou prokazuje distální deleci *TSC2* genu. V dolní části: redukce signálu všech sledovaných exonů *TSC2* a 46. exonu v genu PKD1 ve srovnání s fyziologickou kontrolou prokazuje kompletní deleci testovaného lokusu. Šipky označují vnitřní kontrolní produkty.

tandemových repetic, STR) a provést pro ně test ztráty heterozygozity (LOH) v hamartomatózní tkáni [14].

Po odhalení a potvrzení mutace nebo nalezení vazby je možno definitivně potvrdit klinicky nejasnou diagnózu, nabídnout rodině vyšetření příbuzných v riziku a případně provést prenatální diagnostiku.

Závěr

Povědomí o TSC se za poslední léta výrazně zvýšilo. Souvisí to s rozvojem poznatků a jejich patřičnou medializací jak mezi odbornou veřejností, tak i u rodin s výskytem TSC. Diagnostika na základě fenotypových projevů při dodržení doporučených vyšetření do značné míry snižuje riziko nezachycení nositele mutace. Stále však neřeší diagnostiku části dětských pacientů s dosud nerozvinutými příznaky choroby, otázku „bezpříznakových" nosičů somatické a gametické mozaiky a prenatální diagnostiku onemocnění. Odhalování mutací v TSC genech má tedy nezastupitelné postavení a výsledek vyšetření je důležitý pro zvolení vhodné péče o nemocného, správnou genetickou konzultaci a samozřejmě pro prenatální diagnostiku.

Dosavadní výsledky testování TSC genů v ČR již byly podkladem pro sedm prenatálních vyšetření a nyní je připravována první preimplantační genetická diagnostika (PGD).

Některá pracoviště s robustně zavedenou technologií sekvencování volí cestu přímé sekvenace veškeré kódující DNA obou genů TSC.

Je pravděpodobné, že v blízké budoucnosti se diagnostika relativně četných geneticky podmíněných onemocnění bude ubírat směrem k mikročipovým technologiím, které podstatně urychlí odhalování mutací.

Na základě našich zkušeností a přístrojových možností našeho pracoviště se jeví námi navrhovaná strategie diagnostiky TSC v současné době jako optimální, neboť je komplexní, přiměřeně spolehlivá a v dané situaci nejekonomičtější.

Literatura

1. Roach ES, Sparagana SP. Diagnosis of tuberous sclerosis complex. J Child Neurol 2004; 19(9): 643–649.

2. Vrtěl R, Šantavá A, Šantavý J, Polák P, Krejčiříková E. DNA diagnostika u českých pacientů s tuberózní sklerózou. Čas Lék čes 2000; 139: 203–207.

3. Gomez MR. Tuberous Sclerosis. 3rd ed. New York: Raven Press 1999.

4. van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S et al. Identification of the tuberous sclerosis gene *TSC1* on chromosome 9q34. Science 1997; 277(5327): 805–808.

5. The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and Characterization of the Tuberous Sclerosis Gene on Chromosome 16. Cell 1993; 75(7): 1305–1315.

proLékaře.cz | 6.11.2026

6. Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW, Maynard J, Idziaszczyk S, Tomkins S et al. Comprehensive mutation analysis of *TSC1* and *TSC2* and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. Am J Hum Genet 1999; 64(5): 1305–1315.

7. Mayer K, Ballhausen W, Rott HD. Mutation screening of the entire coding regions of the *TSC1* and the *TSC2* gene with the protein truncation test (PTT) identifies frequent splicing defects. Hum Mutat 1999; 14(5): 401–411.

8. Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, Chung J et al. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of *TSC2*, compared with *TSC1*, disease in multiple organs. Am J Hum Genet 2001; 68(1): 64–80.

9. Sancak O, Nellist M, Goebloed M, Elfferich P, Wouters C, Maat-Kievit A et al. Mutational analysis of the *TSC1* and *TSC2* genes in diagnostic setting: genotype-phenotype correlations and comparsion of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex. Eur J Hum Genet 2005; 13(6): 731–741.

10. Rendtorff ND, Bjerregaard B, Frödin M, Kjaergaard S, Hove H, Skovby F et al. Danish Tuberous Sclerosis Group: Analysis of 65 tuberous sclerosis complex (TSC) patients by *TSC2* DGGE, *TSC1*/*TSC2* MLPA, and *TSC1* longrange PCR sequencing, and report of 28 novel mutations. Hum Mutat 2005; 26(4): 374–383.

11. Hung CC, Su YN, Chien SC, Liou HH, Chen CC, Chen PC et al. Molecular and clinical analyses of 84 patients with tuberous sclerosis complex. BMC Med Genet 2006; 18: 72.

12. Kozlowski P, Roberts P, Dabora S, Franz D, Bissler J, Northrup H et al. Identification of 54 large deletions/duplications in *TSC1* and *TSC2* using MLPA, and genotypephenotype correlations. Hum Genet 2007; 121(3–4): 389–400.

13. Au KS, Williams AT, Roach ES, Batchelor L, Sparagana SP, Delgado MR et al. Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States. Genet Med 2007; 9(2): 88–100.

14. Vrtěl R, Vodička R, Šantavá A, Šantavý J, Krejčiříková E. Angiomyolipomy – přínos jejich vyšetření v prenatální diagnostice tuberózní sklerózy. Čas Lék čes 2004; 143(3): 195–197.