

INDIRECT NEUROFIBROMATOSIS TYPE I DIAGNOSIS IN SLOVAK FAMILIES USING RFLP

MEZENSKA R, DUROVCIKOVA D, BEHULOVA R, LUKACOVA M, LOZSEKOVA A, SIMKO J

NEPRIAMA DIAGNOSTIKA NEUROFIBROMATÓZY TYP 1 POMOCOU RFLP V SLOVENSKÝCH RODINÁCH

Abstract

Mezenska R, Durovcikova D, Behulova R, Lukacova M, Lozsekova A, Simko J:
Indirect neurofibromatosis type I diagnosis in Slovak families using RFLP
 Bratisl Lek Listy 2000; 101 (3): 130–133

Neurofibromatosis type I clinical diagnosis confirmation as well as antenatal diagnostics of the disease are recently provided by molecular genetics. The authors analyze 17 Slovak families with multiple NFI incidence, in whom the detection of mutated gene transfer was performed using indirect diagnostics-bound with of restrictive fragments length polymorphism RFLP. With the help of PCR 7 polymorphic sequences were amplified and subsequently broken with restrictive endonucleases localized close to the neurofibrin gene. The system informative capacity was comparable with the results of other Caucasian population studies. Although direct detection of mutation is the perspective of the diagnostics, binding analysis in informative families with multiple incidence of the disease provides reliable and cheaper possibility of NFI diagnostic on the level of DNA analysis. (Tab. 1, Fig. 3, Ref. 26.)

Key words: neurofibromatosis, restrictive fragments length polymorphism (RFLP), indirect diagnostic.

Neurofibromatóza typu I (NFI) patrí medzi dedičné choroby s najvyššou populačnou incidenciou. Je to monogénovo podmienené ochorenie, ktorého hlavnou črtou je vznik početných tumorov z fibrózneho tkaniva lokalizovaných pozdĺž priebehu periférnych nervov, s vysokou predispozíciou k malígnej transformácii (5, 6).

Široká variabilita klinických príznakov a ich podobnosť s inými nozologickými jednotkami často znemožňujú jednoznačnú diagnostiku len na základe klinického obrazu. Údaje o frekvencii

Abstrakt

Mezenská R., Ďurovčíková D., Behulová R., Lukáčová M., Lozseková A., Šimko J.:
Nepriama diagnostika neurofibromatózy typ 1 pomocou RFLP v slovenských rodinách
 Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 3, s. 130–133

Potvrdenie klinickej diagnózy neurofibromatózy typu I a prenatálna diagnostika tohto ochorenia sa presúvajú do rovín molekulevej genetiky. Autori analyzovali 17 slovenských rodín s viacnásobným výskytom NFI, u ktorých využili na detekciu prenosu mutovaného génu nepriamu diagnostiku — väzbu s polymorfizmami dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP). Pomocou PCR amplifikovali a následne reštrikčnými endonukleázami štiepili 7 polymorfnych sekvencií, ktoré sa nachádzajú v blízkosti génu pre neurofibrín. Informatívnosť systémov bola podobná ako v iných štúdiách z kaukazskej populácie. Aj keď perspektívne bude diagnostika smerovať k priamej detekcii mutácií, väzbová analýza v informatívnych rodinách s viacnásobným výskytom ochorenia poskytuje zatiaľ spoľahlivú a lacnejšiu možnosť diagnostiky NFI na úrovni DNA-analýzy. (Tab. 1, obr. 3, lit. 26.)

Kľúčové slová: neurofibromatóza, polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP), nepriama diagnostika.

výskytu ochorenia sa nachádzajú v rozmedzí od 1:2500 do 1:5000 bez výraznejších regionálnych a etnických rozdielov (6, 7, 14, 20).

Vďaka vysokej frekvencii a často závažným prejavom týchto ochorení stále naliehavejšie vystupuje požiadavka na prenatálnu diagnostiku v niektorých rodinách s ťažko postihnutými členmi. Klonovanie a mapovanie génu pre NFI v poslednom období umožnilo rozšírenie spektra diagnostických možností aj o metódy molekulárnej genetiky.

Centre of Medical Genetics, School of Medicine, Comenius University, Bratislava. bl@fmed.uniba.sk

2nd Department of Pediatric Dermatology, University Hospital of Children, Bratislava

Address for correspondence: J. Simko, MD, RND, PhD, Centre of Medical Genetics, LFUK, Spitalska 10, SK-810 01 Bratislava 11, Slovakia.
 Phone: Fax:

Centrum lekárskej genetiky Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a 2. detská kožná klinika Detskej fakultnej nemocnice s poliklinikou v Bratislave

Adresa: MUDr. RNDr. J. Šimko, CSc., Centrum lekárskej genetiky FN, Špitálska 10, 810 01 Bratislava 11.

Genetika neurofibromatózy I

Už v 20. rokoch tohto storočia vznikla myšlienka o autozómovo dominantnom type dedičnosti NFI.

30—50 % postihnutých má zdravých rodičov, čo vypovedá o vysokej frekvencii spontánných, de novo vznikajúcich mutácií zapríčínujúcich toto ochorenie (15, 16, 18). Len asi 41 % postihnutých mužov a 75 % postihnutých žien majú potomkov. Vplyv na fertilitu postihnutých NFI nie je priamy, ale ich znížená reprodukčná schopnosť je spojená s psychosociálnymi dôsledkami fenotypových prejavov ochorenia. Penetrancia ochorenia je prakticky 100 % (5, 18).

Neurofibromatóza je príkladom extrémnej variability expresivity fenotypových príznakov ochorenia. Nezistila sa výrazná korelácia medzi typom a lokalizáciou mutácií v génoch pre NFI a určitým fenotypovým prejavom. Variabilita príznakov u nositeľov rovnakej mutácie v jednej rodine je často taká široká, že skôr nájdeme podobné črty medzi príslušníkmi rozličných rodín ako medzi príbuznými navzájom. Určitá signifikantná korelácia podobnosti sa potvrdila len medzi prvostupňovými príbuznými, ale ani príznaky medzi monozygotnými dvojčatami nie sú totožné (7, 8, 18, 20).

Molekulárna biológia génu pre NFI

Gén pre NFI bol mapovaný do pericentrického regiónu chromozómu 17 roku 1987. Nálezy špecifických translokácií u pacientov s neurofibromatózou a následné využitie väzbovej analýzy lokalizovali gén pre NFI do lokusu 17.q.11.2 (3, 9).

Roku 1990 bol klonovaný gén pre NFI. Je dlhý približne 350 kb, kóduje transkript mRNA dĺžky od 11 kb do 13 kb, obsahuje najmenej 56 exónov a má otvorený čítací rámec v dĺžke 8454 nukleotidov. Na 3'konci sa nachádza neprepisujúca sekvencia dĺžky najmenej 2 kb. Polypeptid vznikajúci prekladom čítacieho rámca sa skladá z 2818 aminokyselín s molekulovou hmotnosťou asi 327 kDa (10, 21, 22).

Mutácie sú rozptýlené po celej dĺžke génu a zahŕňujú široké spektrum od bodových po rozsiahle delécie. Ich spoločnou črtou je, že všetky, ktoré vedú k fenotypu neurofibromatózy, zapríčínujú stratu funkčného proteínu. Tento nález viedol k úvahe, že NFI patrí do skupiny tumor-supresorových génov (19, 21).

Detekcia mutácií v géne pre NFI preukázala, že neexistujú „hot spots“ oblasti — preferenčné miesta výskytu mutácií. Ich výskyt v géne je viac-menej rovnomerne rozptýlený (2, 21, 22, 23).

Produktom génu pre NFI je polypeptid *neurofibrin* identifikovaný roku 1992, dĺžky 2818 aminokyselín s molekulovou hmotnosťou 327 kDa (18).

Funkcia neurofibrínu ako tumor-supresorového faktora nebola dodnes presne objasnená. Viaceré štúdie posledných rokov však naznačujú, že tento polypeptid sa zúčastňuje na tumorigenéze v spolupráci s p21-ras protoonkogénom. p21-ras proteín je v normálne sa vyvíjajúcich cicavčích bunkách väčšinou v inaktívnej GDP viažúcej forme. Jeho aktívna forma viažúca GTP zrejme cez cAMP výrazne ovplyvňuje bunkovú proliferáciu a diferenciáciu.

Zmenu p21-ras-GTP na p21-ras-GDP ovplyvňuje rozhodujúcou mierou neurofibrín ako GAP-proteín. Neurofibrín na mikrotubuloch mení p21-ras-GTP (aktívnu formu) na p21-ras-GDP (inaktívnu formu ras proteínu). Nepritomnosť neurofibrínu znemožní túto zmenu, väčšina ras proteínu sa fosforyluje na aktívnu GTP formu, ktorá cez cAMP stimuluje nekontrolovanú, „nádorovú“ proliferáciu buniek (4, 18, 21).

Diagnostika NFI na úrovni DNA-analýzy

Uviedli sme, že neurofibromatóza je zapríčinená mutáciami v géne pre neurofibrín. Neporušený gén produkuje dostatočné množstvo polypeptidu, ktorý supresuje vznik ochorenia.

Každý gén môže byť postihnutý veľmi pestrou škálou mutácií. Zmenený polypeptid je väčšinou výsledkom mutácie v kódujúcich sekvenciách — exónoch. Mutácie v intrónoch spravidla nemajú žiaden dôsledok. Výnimkou je mutácia splicingového miesta, promotóru alebo polyA stabilizujúcej sekvencie (7, 12).

Keďže gén zodpovedajúci za vznik NFI má komplikovanú štruktúru a mutácie sa nesústreďujú v „hot spots“ oblastiach, využívame v našich podmienkach na diagnostiku tzv. *nepriamu genotypovú analýzu*. Pomocou nej samotnú mutáciu nedetegujeme, diagnostikujeme len prenos mutácie na základe väzby medzi príslušným génom a blízko ležiacim polymorfizmom dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP — restriction fragment length polymorphism). Hovoríme o *nepriamej diagnóze DNA pomocou väzby s RFLP*. Obmedzením tejto metódy je nevyhnutnosť analyzovať väzbové vzťahy medzi RFLP a lokusom zodpovedným za patologický stav, teda zistiť, ktorý reštrikčný fragment leží na tom istom chromozóme ako patologická alela. Z toho vyplýva i podmienka, že pri nepriamej diagnostike nestačí vyšetriť iba pacienta, ale aj jeho rodičov a aspoň jedného ďalšieho postihnutého člena rodiny. Ak máme iba jedného žijúceho nositeľa mutácie a materiál od zosnulých príbuzných, ktorí boli postihnutí, nie je k dispozícii, nepriama analýza nie je možná. Druhou podmienkou je, že aspoň jeden rodič je dvojnásobný heterozygot, t.j. heterozygot na lokuse zodpovednom za ochorenie a súčasne heterozygot pre RFLP. Ďalej je nutné, aby bol vyšetrený polymorfizmus v úplnej, alebo aspoň veľmi tesnej väzbe s lokusom zodpovedným za ochorenie. V dôsledku rekombinácie medzi lokusom a markerom vzniká totiž riziko diagnostického omylu, ktoré rastie so zvyšujúcim sa percentom rekombinácie. Napriek uvedeným nevýhodám je nepriama analýza často jedinou možnosťou diagnostiky viacerých závažných, predovšetkým dominantne dedičných ochorení. Haplotypovú analýzu s pozitívnym polymorfizmom dĺžky reštrikčných fragmentov RFLP prezentovali vo svojich prácach viacerí autori (1, 6, 9, 11, 13, 17, 25), ktorých metodiky sme použili na zavedenie nepriamej diagnostiky neurofibromatózy typu 1 v našom laboratóriu.

Materiál a metódy

Krv od pacientov so susp. diagnózou neurofibromatózy typ 1, ako aj od ich príbuzných boli do Centra lekárskej genetiky FN zasielané z takmer všetkých oddelení lekárskej genetiky na Slovensku. Celkovo sme získali materiál od 85 NFI rodín.

Genómová DNA sa získala použitím setu – Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, USA).

PCR sme uskutočnili automaticky použitím termálneho cyklera TECHNE CYCLOGENE.

V tabuľke 1 je veľkosť PCR produktov a veľkosť DNA-fragmentov detegovaných použitím príslušných reštrikčných enzýmov.

Produkty PCR sme detegovali elektroforetickou separáciou v 1,5 % agarózovom géli s použitím TBE tlmivého roztoku pri 200 mA 2—3 hodiny v závislosti od veľkosti amplifikačných fragmentov. DNA sme vizualizovali pomocou EtBr, ktorý sme pridali priamo do gélu (konc. 0,5 g/l), presvietením na UV transiluminá-

RODOKMEŇ

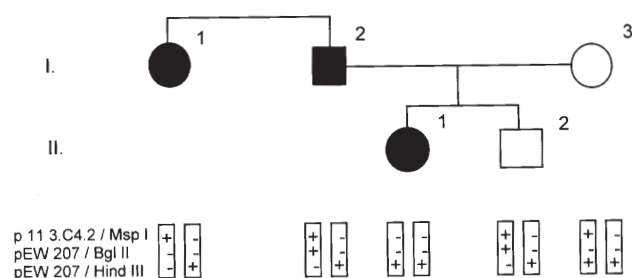


Fig. 1. Family tree with diagnostic suspect neurofibromatosis type Recklinghausen.

Obr. 1. Rodokmeň rodiny, u ktorej bola diagnostikovaná suspektná neurofibromatóza typu Recklinghausen.

tore. Ako štandard molekulevej hmotnosti DNA sme použili komerčne dodávaný syntetický 100 bp ladder.

Výsledky

Z 85 rodín, ktorých krv bola zaslaná do laboratória Centra lekárskej genetiky, bolo možné urobiť nepriamu DNA-diagnostiku u 30 rodín (35,292 %). U 55 rodín (64,701 %) nebolo možné túto diagnostickú metódu použiť z viacerých dôvodov. U 13 rodín (15,293 %) bola príčinou nechota pacientov a jednotlivých členov rodín spolupracovať s lekárom.

V 42 rodinách (49,408 %) sa nenachádzal druhý postihnutý jedinec, čo je nevyhnutnou podmienkou použitia tejto metódy. Pomocou väzby s RFLP sme dosiaľ vyšetrili 17 rodín, z ktorých 4 neboli informatívne pre žiaden z uvedených systémov. V 4 rodinách bol informatívny iba jeden systém, v piatich dva systémy a v prípade 4 rodín sme zistili tri informatívne systémy.

Aplikáciu haplotypovej analýzy na NFI väzbové markery uvádzame na príklade rodiny, u ktorej bola diagnostikovaná suspektná neurofibromatóza typu Recklinghausen (obr. 1).

Z výsledkov reštrikčnej analýzy sme zistili, že rodina je informatívna pre 3 nasledujúce polymorfizmy: p113.C4.2/MspI, pEW207/BglII, pEW207/HindIII. Pacientka II/1 zdedila od svojho otca I/2 haplotyp--+, s ktorým je ochorenie asociované, a súčasne je zhodný s haplotypom otcovej sestry I/1, ktorá je tiež postihnutá. II/1 zdedila od svojej matky I/3 haplotyp --+, ktorý je síce identický s haplotypom zdedeným od otca, v rodine matky však

nie je asociovaný s ochorením. Prítomnosť dvoch rovnakých haplotypov, z ktorých len jeden je asociovaný s ochorením, komplikuje identifikáciu patologickej alely v prípade ďalšej generácie.

Zdravý syn II/2 zdedil od svojho otca I/2 haplotyp ++- a od matky --+.

Na obrázkoch 2 a 3 sú výsledky reštrikčnej analýzy dvoch z uvedených informatívnych systémov rodiny.

Neurofibromatóza typu 1 patrí do skupiny najviac frekventovaných, potenciálne závažných ľudských genetických ochorení. Dedí sa autozómovo dominantne s takmer 100 % penetranciou, no variabilnou expresivitou, pričom polovica diagnostikovaných osôb sa považuje za nositeľov de novo vznikajúcich mutácií (10, 20).

Identifikácia génu pre NFI, určenie jeho presnej lokalizácie a štruktúry, klonovanie a sekvenovanie celej cDNA a časti nekódujúcich úsekov prenieslo diagnostiku tohto ochorenia na molekulárnu úroveň.

Priama detekcia špecifických mutácií nie je zatiaľ možná u všetkých rodín postihnutých NFI, pretože dĺžka génu i rozmanitosť mutácií zapríčínujúcich ochorenie robia často diagnostiku časovo i finančne veľmi náročnou. Možnosti priamej analýzy preto závisia vo veľkej miere od prístrojového vybavenia, ako aj materiálneho zabezpečenia jednotlivých pracovísk.

Analýza pomocou väzby má však niekoľko nevýhod. Je to predovšetkým možnosť diagnostického omylu v dôsledku rekombinácie pri určení väzby polymorfizmu s lokusom zodpovedným za ochorenie v postihnutej rodine. Možnosť omylu je tým väčšia, čím ďalej od mutácie sa polymorfizmus (marker) nachádza. Použitie viacerých polymorfizmov diagnostiku spresňuje. Dôležitá je lokalizácia, ako aj počet použitých markerov. Najvhodnejšou sa javí kombinácia intragénových a susediacich markerov, pretože umožňuje pomerne ľahko detegovať aj rekombináciu ležiacu vo vnútri génu.

Ďalšou nevýhodou nepriamej analýzy je nevyhnutnosť výskytu aspoň dvoch postihnutých jedincov informatívnych pre použité polymorfizmy. Vivarelli a spol. (25) uvádzajú, že ich vyšetrovaný súbor obsahoval 6 rodín, ktoré boli informatívne pre dva a viac použitých polymorfizmov, tri rodiny boli informatívne iba pre jeden systém a tri pre žiaden z uvedených systémov. Proporcionálne podobné výsledky dosiahli aj ďalší autori (1, 8, 15, 19, 26).

V našom súbore bolo deväť rodín informatívnych pre dva a viac použitých polymorfizmov, štyri v prípade jedného systému a štyri neboli informatívne pre žiaden z uvedených systémov, čo je porovnateľné s opísanými štúdiami. Sporadické prípady tvoria v našom súbore s 85 NFI rodín 49,408 %.

Pascou väzbovej analýzy je možná aj chyba v klinickej diagnostike ochorenia. Úspešnosť molekulárnej diagnostiky preto často priamo závisí od skúseností klinického genetika a jeho schopnosti rozpoznať príznaky NFI, čo môže byť predovšetkým v počiatočných štádiách ochorenia a pri jeho miernych formách veľmi náročné (5).

Záver

V súčasnosti stále viac rodín postihnutých neurofibromatózou typu Recklinghausen žiada informácie týkajúce sa prognózy, výskytu a možnosti včasnej, resp. prenatálnej diagnostiky tohto ochorenia (24). Metódy molekulárnej genetiky nám umožňujú nielen spresniť výsledok klinickej diagnózy, ale aj predpovedať dedenie ochorenia do ďalších generácií. Nepriama analýza pri použití väzby s RFLP polymorfizmami je jednou z možností uskutočnenia tejto diagnostiky.

Tab. 1. Size of PCR products and DNA fragments.
Tab. 1. Veľkosti PCR-produktov a DNA-fragmentov.

Primer	Enzyme	Size of PCR product	Size of DNA fragments
Primer	Enzým	Veľkosť PCR-produktu (bp)	Veľkosť DNA-fragmentov
pHHH202	RsaI	306	188/108
p11.3C4.2	MspI	1080	920/160
Exon 5	RsaI	113	70/43
pEW206	MspI	349	180/169
p2.F9.8	RsaI	650	460/400, 60
pEW207	BglII	587	368/219
pEW207	HindIII	587	390/197

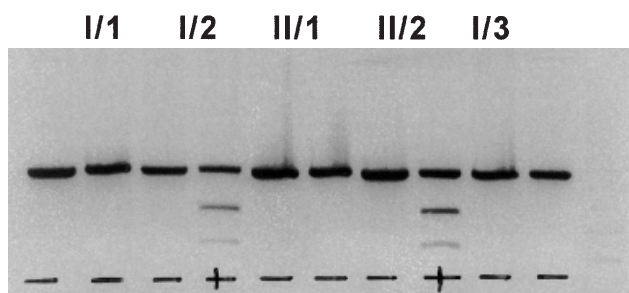


Fig. 2. Results of the pEW207 system analysis. Particular PCR products were broken by restrictive Bgl II enzyme. The figure shows the position of the family members in family tree. Symbol — is for unsplit, and symbol + split DNA.

Obr. 2. Výsledky analýzy systému pEW207. Príslušné PCR-produkty boli štiepené reštrikčným enzýmom BglII. Označenie na obrázku zodpovedá postaveniu členov rodiny v rodokmeni. Symbol — označuje neštiepenú, + štiepenú DNA pacientov.

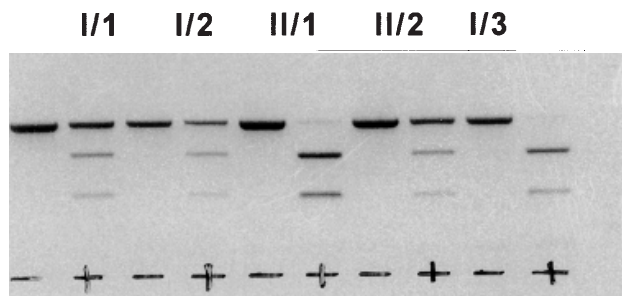


Fig. 3. Results of pEW207 system analysis. Particular PCR products were cleaved by restrictive Hind III enzyme. The figure shows the position of the family members in family tree. Symbol — is for unsplit, and symbol + split DNA.

Obr. 3. Výsledky analýzy systému pEW207. Príslušné PCR-produkty boli štiepené reštrikčným enzýmom HindIII. Označenie na obrázku zodpovedá postaveniu členov rodiny v rodokmeni. Symbol — označuje neštiepenú, + štiepenú DNA pacientov.

Literatúra

- Ainsworth P.J., Rodenhiser D.I.: Rapid nonradioactive detection by PCR of pHHH202/Rsa I RFLP linked to neurofibromatosis type I. *Amer. J. Hum. Genet.*, 49, 1991, s. 1098—1099.
- Ainsworth P.J. a spol.: Identification and characterization of sporadic and inherited mutations in exon 31 of the neurofibromatosis (NFI) gene. *Hum. Genet.*, 91, 1993, s. 151—156.
- Asamoah A. a spol.: 17q inversion involving the neurofibromatosis type one locus in a family with neurofibromatosis type one. *Amer. J. Med. Genet.*, 60, 1995, s. 312—316.
- DeClue J.E. a spol.: Abnormal regulation of mammalian p21(ras) contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type1) neurofibromatosis. *Cell*, 69, 1992, s. 265—273.
- Ďurovčíková D., Halás M., Lukáčová M.: Súčasné poznatky o neurofibromatóze. *Lek. Obzor*, 11, 1995, s. 335—338.
- Elyakim S. a spol.: Neurofibromatosis Type I (NFI) in Israeli Families: Linkage Analysis as a diagnostic Tool. *Amer. J. Med. Genet.*, 53, 1994, s. 325—334.
- Ferák V., Sršeň Š.: Genetika človeka. Bratislava, Slovenské pedagogické nakladateľstvo 1990, 447 s.
- Hall J.G.: Possible maternal and hormonal factors in neurofibromatosis. *Neurology*, 24, 1974, s. 1144.
- Hoffmayer S., Assum G.: An Rsa I polymorphism in the transcribed region of the neurofibromatosis (NFI)-gene. *Hum. Genet.*, 93, 1994, s. 481—482.
- Hoffmayer S. a spol.: Nearby stop codons in exons of the neurofibromatosis type 1 gene are disparate splice effectors. *Amer. J. Hum. Genet.*, 62, 1998, s. 269—277.
- Hofman K.J., Boehm C.D.: Familial neurofibromatosis type I: Clinical experience with DNA testing. *J. Pediatrics*, 3, 1992, s. 394—398.
- Lázaro C.A. a spol.: Novel alleles, hemizygoty and deletions at an Alu-repeat within the neurofibromatosis type 1 (NFI) gene. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1993, s. 725—730.
- Lázaro C.A. a spol.: Prenatal diagnosis of neurofibromatosis type I from flanking RFLPs to intragenetic microsatellite markers. *Prenatal Diag.*, 15, 1995, s. 129—134.

- Lázaro C.A. a spol.: Sex differences in mutational rate and mutational mechanism in the NFI gene in neurofibromatosis type I patients. *Hum. Genet.*, 98, 1996, s. 696—699.
- Littler M., Morton N.E.: Segregation analysis of peripheral neurofibromatosis (NFI). *J. Med. Genet.*, 27, 1990, s. 307—310.
- Park V.M., Pivnick E.K.: Neurofibromatosis type I (NFI): a protein truncation assay yielding identification of mutations in 73 % patients. *J. Med. Genet.*, 35, 1998, s. 813—820.
- Rodenhiser D.I. a spol.: A genetic study of neurofibromatosis type I (NFI) in south-western Ontario. A PCR based approach to molecular and prenatal diagnosis using linkage. *J. Med. Genet.*, 30, 1993, s. 363—368.
- Scriver Ch.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D.: The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, I.N.C Acad. Press 1995.
- Sedláček Z., Mareš J., Goetz P.: Tumor supresorové geny. *Čas. Lék. čes.*, 136, 1997, s. 11—16.
- Sršeň Š., Sršňová K.: Základy klinickej genetiky. Martin, Osveta 1995, 259 s.
- Stark M. a spol.: Analysis of segregation and expression of an identified mutation at the neurofibromatosis type 1 locus. *Hum. Genet.*, 90, 1992, s. 356—359.
- Stephens K. a spol.: Preferential mutation of the neurofibromatosis type I gene in paternally derived chromosomes. *Hum. Genet.*, 88, 1992, s. 279—282.
- Upadhyaya M. a spol.: Characterisation of germline mutations in the neurofibromatosis type I (NFI) gene. *J. Med. Genet.*, 32, 1995, s. 706—710.
- Upadhyaya M. a spol.: Prenatal diagnosis and presymptomatic detection of neurofibromatosis type I. *J. Med. Genet.*, 29, 1992, s. 180—183.
- Vivarelli R. a spol.: Diagnosis of neurofibromatosis type I using RFLPs tightly linked to gene. *Child. Nerv. Syst.*, 9, 1993, s. 147—149.
- Zoller M. a spol.: Life expectancy, mortality and prognostic factors in neurofibromatosis type I. *Acta Derm. Venereol.*, 75, 1995, s. 136—140.

Received November 17, 1999.

Accepted February 11, 2000.