

Neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1 (NF1) – klinický obraz a molekulárně-genetická diagnostika

Bořivoj Petrák¹, Šárka Bendová², Jiří Lisý³, Josef Kraus¹, Tomáš Zatrapa⁴, Marie Glombová¹, Josef Zámečník⁵

¹ *Klinika dětské neurologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha*

² *Ústav biologie a lékařské genetiky, 2. LF UK a FN Motol, Praha*

³ *Klinika zobrazovacích metod, 2. LF UK a FN Motol, Praha*

⁴ *I. ortopedická klinika, 1. LF UK a FN Motol, Praha*

⁵ *Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha*

SOUHRN

Neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1 (NF1) je multisystémové, autozomálně dominantně dědičné neurokutánní onemocnění charakterizované postižením kůže, centrálního a periferního nervového systému, oka, kostí a cévní stěny. Incidence je 1:3000 živě narozených dětí. Příčinou rozvoje onemocnění je mutace tumor supresorového genu *NF1* (17q11.2) a z toho vyplývající porucha tvorby neurofibrominu - cytoplazmatického proteinu, přednostně exprimovaného v neuronech, Schwannových buňkách, oligodendrocytech, astrocytech a leukocytech. Hlavní úkolem neurofibrominu je jeho funkce negativního regulátoru komplexu Ras. Porucha této funkce je u NF1 dávana do souvislosti s výskytem mnohočetných nádorových procesů, které histologicky odpovídají hamartomům nebo benigním nádorům. Nádory centrálního nervového systému jsou především gliomy nízkého gradu (pilocytární astrocytom, grade I), zvláště v průběhu zrakové dráhy. Tyto nádory jsou často klinicky asymptomatické. Gliomy bývají časté také v oblasti mozkového kmene a mohou být nalezeny také jinde v mozku a v míše. Hydrocefalus může být u NF1 komplikací gliomu nebo vzniká při stenóze distální části mokovodu. V periferním nervovém systému se objevují neurofibromy a plexiformní neurofibromy. Plexiformní neurofibromy mají významné celoživotní riziko malignizace.

Klinická diagnóza NF1 je definována sedmi diagnostickými kritérii a ke stanovení diagnózy je nutný nálezn alespoň dvou z nich. Metodika přímé DNA analýzy rozsáhlého *NF1* genu (61 exonů) je vypracována. Výsledky studií genotyp-fenotyp jsou ale málo průkazné a predikce průběhu onemocnění podle nalezené mutace není v současné době možná. Frekvence sporadického výskytu NF1 je vysoká (30 - 50 %). Variabilita fenotypu onemocnění je výrazná i v rámci jedné rodiny. Kauzální terapie není v současné době známa - léčba je symptomatická. Při progredujícím low-grade gliomu je metodou volby chemoterapie, pro plexiformní neurofibromy chirurgické řešení.

Klíčová slova: NF1 – neurofibromin – gliom – neurofibrom – hydrocefalus – genetika

Neurofibromatosis von Recklinghausen type 1 (NF1) – clinical picture and molecular-genetics diagnostic

SUMMARY

Neurofibromatosis von Recklinghausen type 1 (NF1) is a multisystem, autosomal dominant hereditary neurocutaneous disease characterized by skin, central and peripheral nervous system, eyes, bone, endocrine, gastrointestinal and blood vessel wall involvement. It has an estimated frequency of 1 in 3000. Neurofibromatosis type 1 is caused by mutations in the large *NF1* gene located on chromosome 17q11.2, encoding the cytoplasmic protein neurofibromin. It is expressed in multiple cell types but is highly expressed in Schwann cells, oligodendrocytes, neurons, astrocytes and leukocytes. Neurofibromin is known to act as a tumor suppressor via Ras-GTPase activation, which causes down-regulation of cellular signaling via the Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Failure of this function is associated with a tendency to form tumors which are histologically hamartomas as well as benign tumors. Tumors of the central nervous system include low-grade gliomas (pilocytic astrocytomas grade I), especially optic pathway gliomas. They are often clinically asymptomatic. Other intracranial tumors are in the brain stem and also elsewhere in the brain and spinal cord. Hydrocephalus may be a complication of NF1 gliomas or due to stenosis of the distal part of the aqueduct of Sylvius. Cutaneous and subcutaneous neurofibromas or plexiform neurofibromas are localized in the peripheral nervous system. Plexiform neurofibromas have a significant lifetime risk of malignancy.

The clinical diagnosis of NF1 is defined by diagnostic criteria. The NF1 diagnosis is satisfied when at least two of the seven conditions are met. The method of direct DNA analysis of large *NF1* gene (61 exons) is available. The results of studies of genotype - phenotype established few correlations. But predicting the disease by finding mutations is not currently possible. *NF1* exhibits a wide range of variability of expression and complete penetrance, even within the same family. About half of cases are new mutations. The treatment of patients with neurofibromatosis is symptomatic. Central nervous system symptomatic low-grade gliomas are most often treated with chemotherapy. For plexiform neurofibromas surgical removal is currently the only treatment option.

Keywords: NF1 – neurofibromin – glioma – neurofibroma – hydrocephalus - genetics

Cesk Patol 2015; 51(1): 34-40

Diagnózu neurofibromatózy popsal Friedrich Daniel von Recklinghausen v roce 1882 v práci „Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuronomen“ a dedikoval ji svému učiteli Rudolfu Virchowovi (1). V 70. letech 20. století byla vyčleněna skupina pacientů s oboustrannými

vestibulárními schwannomy (neurinomy) a diagnóza NF se tím rozdělila na typ 1 a typ 2. Následně v 90. letech 20. století byly nalezeny geny pro *NF1* na chromozomu 17 (17q11.2) a pro *NF2* na chromozomu 22 (22q12.2). Potvrdilo se tak, že se nejedná o varianty jednoho onemocnění, ale o dvě samostatné jednot-

ky, které mají odlišný klinický obraz a rozdílný věk manifestace (2-4). Obě diagnózy lze tedy určit na základě klinických i molekulárně genetických charakteristik (2). Dříve používané názvy periferní NF (typ 1) a centrální NF (typ 2) nevystihují charakter jednotlivých diagnóz a proto se již nepoužívají (4,5). NF1 může mít charakter mozaiky. Sem lze zařadit již dříve klinicky vyčleněnou segmentální formu NF1 (dříve nazývaná NF typ V), která představuje mozaiku somatické mutace genu *NF1* (2,5,6).

Neurokutánní syndromy

Neurofibromatózy jsou řazeny do skupiny neurokutánních syndromů, kde NF1 představuje nejčastější onemocnění. Neurokutánní syndromy tvoří skupina chorob, které postihují především kůži a nervový systém, ale současně se mohou objevit také změny v dalších systémech organismu a jedná se tedy o multisystémová onemocnění. Manifestují se od porodu do dospělosti, mají většinou pomalý progresivní charakter a variabilní klinický projev s rizikem častějšího výskytu nádorů kůže, nervového systému a ostatních orgánů. Původní termín *fakomatózy* se již nepoužívá. Nejčastější neurokutánní syndromy mají převážně autozomálně dominantní charakter dědičnosti, ale sporadický výskyt je u těchto jednotek také velmi častý (2,4,5). Za jednotlivý prvek potřebný pro zařazení do této skupiny je v současnosti považována porucha vývoje v oblasti neurální lišty (utváření neurální lišty, migrace nebo závěrečná diferenciací zárodečných buněk) a postižení neuro-ektodermu (2,5,7). Zodpovědné geny mají funkci tumor-suppressor genů (7).

NEUROFIBROMATOSIS VON RECKLINGHAUSEN TYP 1 (neurofibromatosis 1, neurofibromatóza 1. typu, NF1)

Neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1 (NF1) je multisystémové onemocnění charakterizované postižením kůže, centrálního a periferního nervového systému, oka a také kostí a cévní stěny. Hlavní příčinou rozvoje NF1 je inaktivace tumor supresorového genu *NF1* (HGNC:7765; MIM 613113; RefSeq: NM_000267.3) zárodečnými mutacemi. To je spojeno s výskytem mnohočetných nádorových procesů – především periferního a centrálního nervového systému. Tyto nádorové procesy jsou převážně benigního charakteru a histologicky odpovídají hamartomům a benigním nádorům, současně však existuje sklon k jejich maligní transformaci. NF1 má autozomálně dominantní dědičnost (AD), s variabilní expresivitou a prakticky úplnou penetrancí do dospělého věku. Při incidenci 1:3000 živě narozených dětí je jedním z nejčastěji se vyskytujících AD onemocnění u člověka (8). Současně jsou ale časté také nové mutace (30 - 50 %) a téměř polovina případů má tedy sporadický výskyt (5,9). Přitom je častější výskyt nových mutací uváděn na paternálních chromozomech a také výskyt germinální mozaiky je výrazně častější u otců (9). Vysoký sporadický výskyt NF1 nebyl dosud uspokojivě vysvětlen. Jedna z hypotéz uvádí například vliv vyššího věku otce v době početí - na základě dlouhodobé metylace DNA některých spermií se vznikem bodových mutací (9). První příznaky NF1 se většinou manifestují v časném kojeneckém věku. Další diagnostické příznaky jsou věkově vázané a s věkem jejich výskyt stoupá.

✉ Adresa pro korespondenci:

MUDr. Bořivoj Petrák, CSc.

Klinika dětské neurologie UK 2.LF a FN Motol

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

tel.: 224433301, fax: 224433322

e-mail: borivoj.petrak@post.cz

Gen *NF1* a neurofibromin

Gen *NF1* se nachází na dlouhém raménku chromozomu 17 v oblasti q11.2, blízko centromery (17q11.2). Zahrnuje 280 kb genomové DNA, skládá se z 61 exonů a kóduje 12 kb dlouhý transkript mRNA s 9 kb dlouhým otevřeným čtecím rámcem. V sekvenci genu *NF1* se nacházejí 2 rozsáhlé introny, 1 a 27b. Intron 27b obsahuje 3 malé, sobě nepřibuzné geny, *EVI2A*, *EVI2B* a *OMG*. Individuální či společný vliv na expresi genu *NF1* je dosud neznámý (10). Proteinové produkty jsou exprimovány především v mozku (*EVI2A* a *OMG*) a v kostní dřeni (*EVI2A*). Produkt genu *OMG*, *OMGP*, je membránový glykoprotein exprimovaný v centrálním nervovém systému během procesu myelinizace a působí jako inhibitor proliferace neuronů a fibroblastů in vitro (11). **Neurofibromin** (RefSeq: NP_000258.1, UniProtKB P21359-2) je gigantický cytoplazmatický protein (2818 aminokyselin, 320 kDa) kódovaný genem *NF1*, přednostně exprimovaný v neuronech, Schwannových buňkách, oligodendrocytech, astrocytech a leukocytech. V nízkých koncentracích se exprimuje i v mnoha jiných tkáních (12-15). Aktivita neurofibrominu je u pacientů s NF1 omezena. Protein zastává různé biochemické funkce včetně asociace s mikrotubuly a účastní se několika signálních drah (MAPK, cAMP) (16). Neurofibromin patří mezi tzv. savčí GTPázu aktivující proteiny (GAP). Ras-specifické GAP regulují biologickou aktivitu mnoha ostatních proteinů. Cytoplazmatický protein p21^{RAS} o velikosti 21 kDa je kódován geny *H-Ras*, *K-Ras* (Harvey a Kirsten murine sarcoma onkogeny virového původu) a *N-Ras* (lidský neuroblastomový onkogen) a hraje klíčovou roli v buněčné diferenciaci a růstu či v komunikaci mezi cytoplazmatickou membránou a jádrem. Aktivovaný p21^{RAS} interaguje s Raf-MEK-ERK (MAPK) signální drahou, která je zodpovědná za regulaci exprese genů podílejících se na kontrole buněčného cyklu, diferenciaci a migraci buněk. Mutace genů skupiny RAS spolu s haploinsuficiencí nebo úplnou absencí neurofibrominu jsou příčinou udržování p21^{RAS} v aktivním stavu, čímž dochází ke stále stimulaci signální dráhy MAPK a následné proliferaci buněk. Snížená exprese neurofibrominu koreluje s množstvím aktivovaného p21^{RAS} v některých typech nádorů (16,17).

Neurofibromin také pozitivně reguluje intracelulární hladinu cAMP. V NF1-deficientních buňkách je hladina cAMP výrazně snížena, což vede, např. v astrocytech, k inhibici buněčného růstu. Exprese NF1 je do značné míry daná genotypem. Za možné modifikátorové geny jsou považovány geny, které sousedí s genem *NF1* a jsou spolu s ním inaktivovány mikrodelecemi nebo geny mající vliv na mitotickou rekombinaci, a tím také na míru ztráty heterozygoty (LOH) (18). Vysvětlením vysoké inter- i intra-familiární variability fenotypu pacientů s NF1 mohou být kromě modifikátorových genů také alelická heterogenita, mutace druhého zásahu, somatický mozaicismus, vliv prostředí nebo epigenetické změny. Dosud bylo v genu *NF1* nalezeno přes 1300 kauzálních mutací (19). Jedná se o mutace bodové (missense, nonsense), posunové (insertce, delece, duplikace), sestřihové a velké genové přestavby. Žádná mutace regulačního charakteru nebyla doposud nalezena. Přibližně 30 - 50 % mutací v genu *NF1* vzniká během embryonálního vývoje probanda (*de novo*) a manifestují se pak jako sporadické případy onemocnění NF1 v rodině. Způsob manifestace onemocnění nekoreluje s pohlavím ani etnikem probandů. Mezi nejčastější příčiny onemocnění NF1 patří mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu *NF1*. Více než 80% zárodečných mutací způsobuje posun čtecího rámce s následným vznikem předčasného terminačního kodonu (20,21). Tento typ mutací je spojený především s absencí nebo sníženou mírou exprese mRNA (22). Missense, tiché mutace a in-frame varianty (delece resp. insertce jedné nebo více aminokyselin), které nejsou zodpovědné za vznik předčasného terminačního kodonu, s velkou pravděpodobností ovlivňují terciární strukturu neurofibrominu, a tím i jeho správnou funkci (23,24). Mutace jsou,