

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Lada Hegedúsová**

Variabilní expresivita u neurofibromatózy typu I

Variable expressivity in neurofibromatosis type I

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

**RNDr. Michaela Schierová, PhD.**

Praha, 2025

**Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala především vedoucí mé práce, RNDr. Michaele Schierové, PhD., za veškerou její trpělivost, laskavost a cenné rady, které mi během psaní bakalářské práce dávala.

Děkuji také své rodině, která mě ve studiu podporovala.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Narysově, 28. 4. 2025

Podpis .....

## Abstrakt

Neurofibromatóza typu I je autozomálně dominantní choroba způsobená mutacemi v genu *NF1*, který kóduje protein neurofibromin, tumorsupresor a významný regulátor mnoha buněčných procesů, včetně proliferace, karyokineze, organizace cytoskeletu a diferenciacie nervových buněk. Prominentní vlastností této choroby je její mimořádná variabilní expresivita a široká škála klinických projevů. Markantní rozdíly mezi projevy nemoci lze pozorovat nejen mezi rodinami, ale i v rámci jedné rodiny, a to dokonce i u případů monozygotních dvojčat. Mezi faktory přispívající k variabilní expresivitě patří modifikující geny, posttranslační modifikace, alternativní sestřih, ale i epigenetické mechanismy. Konkrétní příčiny fenotypové variability jsou předmětem výzkumu již nejméně 30 let, dodnes však nejsou jednoznačně objasněny.

**Klíčová slova:** neurofibromatóza, variabilní expresivita, genové interakce, gen *NF1*, neurofibromin

## Abstract

Neurofibromatosis type I is an autosomal dominant disorder caused by mutations in the *NF1* gene, which encodes the protein neurofibromin, a tumor suppressor and a key regulator of various cellular processes, including proliferation, karyokinesis, cytoskeletal organization, and neural cell differentiation. A prominent feature of this disorder is its extraordinary variable expressivity and a wide spectrum of clinical features. Striking differences in disease manifestation can be observed not only between families but also within a single family, even in monozygotic twins. Factors contributing to this variable expressivity include modifying genes, post-translational modifications, alternative splicing, and epigenetic mechanisms. The specific causes of phenotypic variability have been a subject of research for at least 30 years, but they remain incompletely understood to this day.

**Keywords:** neurofibromatosis, variable expressivity, genetic interactions, *NF1* gene, neurofibromin

## Seznam zkratek

Zkratka	Zkratka v anglickém jazyce	Zkratka v českém jazyce
AC	Adenylyl cyclase	Adenylát cykláza
AD	Autosomal dominant	Autozomálně dominantní
AKT (PKB)	Protein kinase B	Proteinkináza B
<i>AKT1</i>	Serine/threonine kinase 1 gene	Gen pro serin threoninovou proteinkinázu 1
ASD	Autism spectrum disorder	Porucha autistického spektra
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyklický adenosinmonofosfát
CASK	Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin dependentní serinová proteinkináza
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A
CLS	Café-au-lait spots	Mléčně kávové skvrny
CNF	Cutaneous neurofibromas	Kutánní neurofibromy
CNS	Central nervous system	Centrální nervová soustava
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer	Databáze somatických mutací v nádorových buňkách
CpG	Cytosine–guanine dinucleotide pair in the DNA sequence	Dinukleotidový pár cytosin-guanin v sekvenci DNA
CREB	cAMP-response element binding protein	Transkripční faktor závislý na cAMP, nezbytný pro dlouhodobou paměť
<i>CRLF3</i>	Cytokine receptor-like factor 3 gene	Gen pro faktor 3 podobný cytokinovému receptoru
CSRD	Cystein – serine – rich domain	Doména bohatá na serinové a cysteinové zbytky
CTD	C-terminal domain	C-terminální doména
ER	Endoplasmatic reticulum	Endoplazmatické retikulum
ERK	Extracellular-signal related kinase	Kináza regulovaná extracelulárním signálem
FAK	Focal adhesion kinase	Fokální adhezní kináza
<i>FBNI</i>	Fibrilin-1 gene	Gen pro fibrilin-1
GAP	GTPase-activating protein	GTPázu-aktivující protein
<i>GAS1</i>	Growth arrest specific protein 1	Gen pro protein 1 specifický pro zástavu růstu
GO	Gene Ontology	Databáze funkcí genů
GPCR	G-protein coupled receptor	Receptor spřažený s G-proteinem
GRD	GAP related domain	Doména příbuzná GAP
GRK2	G protein-coupled receptor kinase2	Kináza 2 ovlivňující GPCR

GWAS	Genome wide association study	Celogenomová asociační studie
hNF1-NPC	Human NF1 patient-derived NPCs	Lidské NPC odvozené z buněk pacientů trpících NF1D
HPO	Human Phenotype Ontology	Databáze patologických fenotypů
iPSC	Induced pluripotent stem cells	Indukované pluripotentní kmenové buňky
JAK2	Janus kinase 2	Janusova kináza 2
LIMK2	LIM domain kinase 2	Kináza 2 domény LIM
LOH	Loss of heterozygosity	Ztráta heterozygosity
lncRNA	Long noncoding RNA	Dlouhá nekódující RNA
MAPK	Mitogen-activated kinase	Proteinkináza aktivovaná mitogenem
MAP2K (MEK)	Mitogen-activated protein kinase kinase	Kináza proteinkinázy aktivované mitogenem
MEF	Mouse embryonal fibroblasts	Myší embryonální fibroblasty
MET(HGFR)	Hepatocyte growth factor receptor	Receptor hepatocytárního růstového faktoru
MPNST	Malignant peripheral nerve sheath tumors	Maligní nádory obalů periferních nervů
<i>MSH2</i>	MutS homolog 2 gene	Gen pro homolog bakteriálního proteinu MutS2
mTOR	Mammalian target of rapamycin	Savčí serin/threoninová kináza inhibovaná rapamycinem
<i>MYCN</i>	<i>MYCN</i> proto-oncogene, transcription factor	<i>MYCN</i> protoonkogen, transkripční faktor
MZ	Monozygotic	Monozygotní
NF1	Neurofibromin	Neurofibromin
NF1D/NF2D	Neurofibromatosis (type I, II) disease	Neurofibromatóza (typu I, II)
NGFR	Nerve growth factor receptor	Receptor nervového růstového faktoru
NLS	Nuclear localization signal	Jaderný lokalizační signál
NMD	Nonsense mediated mRNA decay	Degradace mRNA vyvolaná nonsense mutací
NPC	Neural progenitor cells	Neurální progenitorové buňky
ORF	Open reading frame	Otevřený čtecí rámec
PI3K	PI3 kinase	PI3 kináza (Fosfatidylinositol-3-kináza)
PKA	Protein kinase A	Proteinkináza A
PKC	Protein kinase C	Proteinkináza C
PNF	Plexiform neurofibromas	Plexiformní neurofibromy
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	Fosfatáza a homolog tensinu

PTPN11	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11	Nereceptorová tyrosinová proteinová fosfatáza typu 11
Ras	Rat sarcoma virus protein	Malý GTP vázající protein, protoonkogen
<i>RB1</i>	Retinoblastoma gene	Retinoblastomový gen
Rho	Ras homolog	Homolog proteinu Ras
ROCK	Rho-associated kinase	Kináza asociovaná s Rho
RTK	Receptor tyrosine kinases	Tyrosinkinázový receptor
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	PCR spojená s reverzní transkripcí
<i>SDC2</i>	Syndecan-2 gene	Gen pro syndekan-2
shRNA	Short hairpin RNA	RNA s krátkou vlásenkou
SNP	Single-nucleotide polymorphism	Jednonukleotidový polymorfismus
SP1	Specificity protein 1	Sekvenčně specifický DNA vazebný protein
<i>SPRED2</i>	Sprouty related EVH1 domain containing protein 2	Protein 2, příbuzný Sprouty, obsahující doménu EVH1
<i>SUZ12</i>	Suppressor of zeste 12 homolog gene	Gen pro homolog supresoru proteinu zeste 12
TAD	Topologically associating domains	Topologicky asociované domény
TBD	Tubulin binding domain	Doména vázající tubulin
TM	Truncating mutations	Mutace vedoucí ke zkrácení proteinu
<i>TP53</i>	Protein 53 (p53) gene	Gen pro protein 53 (p53)
TSG	Tumor suppressor gene	Tumorsupresorový gen
UTM	Untruncating mutations	Mutace bez zkrácení proteinu, nejčastěji missense
<i>VCP</i>	Valosin containing protein gene	Gen pro protein obsahující valosin
WT	Wild-type	Nemutovaný jedinec/alela

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Cíle bakalářské práce .....	2
3. Typy neurofibromatóz .....	3
3.1 Neurofibromatóza typu I.....	4
4. Gen <i>NF1</i> .....	5
4.1 Somatické změny genotypu <i>NF1</i> v nádorových buňkách .....	6
5. Neurofibromin .....	7
5.1 Izoformy neurofibrominu .....	10
5.2 Interakční partneři neurofibrominu .....	11
5.2.1 Vliv posttranslačních modifikací na funkci neurofibrominu.....	12
5.2.2 Lokalizace neurofibrominu a interakce s cytoskeletem .....	14
5.2.3 Signální dráhy ovlivněné neurofibrominem.....	17
6. Mutace spojené s neurofibromatózou typu I .....	20
6.1 Korelace mezi typem mutace a fenotypem .....	23
7. Variabilní expresivita u neurofibromatózy typu I.....	25
7.1 Detekce fenotypové variability pomocí analýzy rodin.....	26
7.2 Hledání modifikujících genů .....	28
8. Závěr .....	31
9. Seznam použité literatury .....	32

# 1. Úvod

Neurofibromatóza typu I je autozomálně dominantní onemocnění s incidencí přibližně 1 na 3500 jedinců. Projevy této choroby jsou spjaty s širokou škálou fenotypů. Mezi ně patří především kávové skvrny, Lischovy noduly, kutánní a plexiformní neurofibromy a kognitivní poruchy – v jejich vývoji mají klíčovou roli signální dráhy Ras-MAPK a cAMP-PKA (Kaczorowski et al., 2020; Pacot et al., 2024a). V menší míře se u pacientů vyskytují také např. srdeční abnormality či deformace páteře (Shen et al., 1996; Napolitano et al., 2022).

Primární molekulární podstatou této choroby jsou mutace v genu *NF1* kódujícím protein neurofibromin, který podporuje hydrolyzu GTP vázaného na proteinu Ras, čímž protein Ras inaktivuje (Ballester et al., 1990). Inaktivace proteinu Ras omezuje buněčnou proliferaci a potenciální nádorové bujení. Na základě této skutečnosti byl neurofibromin zařazen mezi tumorsupresory (Wallace et al., 1990; Shen et al., 1996). K tumorsupresorové funkci neurofibrominu však přispívá i mnoho dalších interakcí, které objasnily pozdější studie. Jde například o interakce se syndekany či s kaveolinem (Boyanapalli et al., 2006; Volta et al., 2010).

Variabilní expresivita neurofibromatózy je již dlouho předmětem výzkumu. Významné pokroky v něm umožnily nejen zvířecí modely, ale dnes již i lidské tkáňové kultury. Využívány jsou lidské neurální progenitorové buňky odvozené z buněk pacientů trpících neurofibromatózou typu I připravené pomocí metody indukovaných pluripotentních kmenových buněk (Anastasaki & Gutmann, 2014). Velmi slibný je model miniprasete, neboť nejlépe imituje fenotypy pacientů s neurofibromatózou typu I (Isakson et al., 2018). Dříve hojně využívané myši modely mají odlišný fenotyp na organismální úrovni, avšak lze u nich pozorovat změny na úrovni signálních drah (Li et al., 2016).

Metoda GWAS (genome-wide association study) se ukázala jako užitečný nástroj pro identifikaci modifikujících genů spojených s variabilitou klinických projevů neurofibromatózy typu I, což otevírá nové možnosti pro vývoj cílených terapeutických strategií.

Závažné projevy neurofibromatózy, zejména vysoké riziko vzniku maligních nádorů již v dětském věku, podnítily řadu studií zaměřených na neurofibromin a jeho funkce v organismu. Tyto výzkumy postupně vedly k návrhu protokolu pro genovou terapii, jejíž první koncepty byly představeny teprve nedávno. Významné průlomové přínosy v této oblasti přinesli Wallis et al. (2018) a Bai et al. (2019).

## **2. Cíle bakalářské práce**

Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o genu *NF1* kódujícím protein neurofibromin a jeho regulaci, popsat strukturu a funkci tohoto proteinu včetně jeho interakcí s dalšími molekulami. S pomocí těchto informací se pokusím vysvětlit příčiny neobvyklé variability fenotypových projevů neurofibromatózy typu I.

### 3. Typy neurofibromatóz

Neurofibromatóza je dědičně podmíněná choroba postihující především kůži, nervový systém, kosti a oči. Neurofibromatóza typu I (NF1D), které je věnována celá následující podkapitola, je pouze jedním z možných typů neurofibromatózy. Dalšími jsou neurofibromatóza typu II, segmentální neurofibromatóza a také velice vzácná schwannomatóza. Všechny typy jsou stručně charakterizované v **Tabulce č. 1**.

Typ neurofibromatózy	Chromozom s mutovaným genem, jeho produkt, funkce	Stručná charakteristika	Zdroje
<b>Neurofibromatóza typu I</b>	17 <i>NF1</i> neurofibromin – tumorsupresor, negativní regulátor signálních drah Ras/MAPK a PI3K/mTOR	AD*, prevalence 1:4000, variabilní expresivita, viz <i>Kapitola 3.1 a Kapitola 7</i>	(Shen et al., 1996; Tamura, 2021)
<b>Neurofibromatóza typu II</b>	22 <i>NF2</i> merlin – tumorsupresor, moduluje aktivitu signálních drah PI3K/AKT, Raf/MAP2K/ERK a mTOR	AD, nádorové onemocnění, prevalence 1:60 000, schwannomy*, ztráta sluchu	(Evans, 2009; Tamura, 2021)
<b>Schwannomatóza</b>	22 <i>SMARCB1*</i> , <i>LZTR1*</i> <i>SMARCB1/SNF5/INI1</i> – tumorsupresor a klíčová podjednotka SWI/SNF komplexu remodelujícího chromatin <i>LZTR1</i> – tumorsupresor, podílí se na stabilizaci GA* a degradaci proteinů	AD, 15–20 % dědičného původu, ostatní spontánní mutace, prevalence mezi 1:40 000 až 1:1 700 000, větší počet schwannomů, s jejich umístěním nekorelující chronické bolesti	(Piotrowski et al., 2014; Kalimuthu & Chetty, 2016; Tamura, 2021)
<b>Segmentální neurofibromatóza</b>	17 <i>NF1</i> neurofibromin (viz NF1D)	způsobena postzygotickou mutací, pouze buňky postiženého segmentu mají mutovanou alelu genu <i>NF1</i> , prevalence cca 1:50 000 – 1:71 000, projevy totožné s NF1D	(Moss & Green, 1994)

**Tabulka č. 1 – Srovnání odlišných typů neurofibromatóz**

\* AD - autozomálně dominantní

\* schwannomy = většinou benigní nádory vyrůstající ze Schwannových buněk, mohou se vyvinout na periferních nervech či nervových kořenech, je pro ně typický pomalý růst

\* *SMARCB1* - Na SWI/SNF navázaný, s matrix asociovaný aktin-dependentní regulátor chromatinu, podrodina B, člen 1

\* *LZTR1* - Transkripční regulátor 1 podobný leucinovému zipu

\* GA – Golgiho aparát

### 3.1 Neurofibromatóza typu I

Neurofibromatóza typu I (NF1D), také nazývána von Recklinghausenova choroba či periferní neurofibromatóza, patří mezi nejčastější autozomálně dominantní (AD) choroby. Její incidence je světově cca 1:3500, její prevalence 1:4000. Jedná se o chorobu s úplnou penetrancí, je pro ni však charakteristická variabilní expresivita (Shen et al., 1996; Pacot et al., 2024a). Tou se jako první zabýval Riccardi (1981), který ve své studii ukázal, že choroba může vykazovat variabilní expresivitu i v rámci rodin.

Molekulární podstatou neurofibromatózy typu I jsou mutace postihující gen *NF1*, nacházející se na dlouhém raménku 17. chromozomu (přesný lokus: 17q11.2). Tento gen kóduje protein neurofibromin, který se účastní mnoha signálních drah (viz *Kapitola 5.2.3*). Zároveň se jedná o tumorsupresor (Shen et al., 1996).

Pro onemocnění jsou charakteristické kávové skvrny (CLS, „*café-au-lait spots*“), neurofibromy (benigní nádory obalů periferních nervů) a Lischovy noduly na duhovce. Neurofibromy lze dále dělit do několika podtypů. Kutánní neurofibromy (CNF) jsou malé kožní nádory vyskytující se u většiny dospělých pacientů trpících NF1D. Plexiformní neurofibromy (PNS) jsou roptýlenější a obvykle větší nádory, který se vyskytuje pouze u 30–50 % pacientů. Jedná se o typ neurofibromů projevujících se jako difuzní nárůst podkožního vaziva. Obvykle se vyskytují v obličeji, na pokožce hlavy, krku a hrudníku. Zhruba 10–15 % těchto benigních PNF se následně vyvine v agresivní maligní nádory myelinových obalů periferních nervů (MPNST), které jsou hlavní příčinou morbidity NF1D. Dalšími nádory asociovanými s NF1D jsou např. optické gliomy, juvenilní myelomonocytární leukémie (JMML), benigní či maligní feochromocytomy, gastrointestinální nádory aj. (Philpott et al., 2017).

Tři zmíněné stěžejní znaky (CLS, neurofibromy a Lischovy noduly) se objeví u více než 90 % všech pacientů s NF1D již před obdobím puberty či s jejím nástupem, počet lézí je však extrémně variabilní. Častá je i přítomnost pih na netypických místech, především v oblasti podpaždí a třísel. Další znaky se vyskytují pouze u menšiny pacientů trpících NF1D. Patří mezi ně např. poruchy učení, záchvaty, makrocefalie, nízká postava, pseudoartróza a malignita (Shen et al., 1996; Philpott et al., 2017). Mezi další komplikace patří deformace páteře (skolióza, kyfóza, spondylóza), abnormality srdečních chlopní a hypertenze (Napolitano et al., 2022).

NF1D má vysokou míru fenotypové variability, která je ovlivněna minimálně třemi třídami faktorů. První je charakter germinální mutace. Jen u velmi málo mutací lze však spolehlivě odhadnout jejich dopad na fenotyp. Druhým faktorem může být přítomnost určitých modifikujících vlivů, jako jsou např. modifikující geny, pohlavní hormony, mikroprostředí nádoru aj. Třetí faktor souvisí

s inaktivací genu *NF1* v kontextu buněčného typu, v němž k ní dojde, a na fázi ontogeneze, během které k ní dojde, tedy tzv. prostorově-časová variabilita (Brosseau et al., 2018).

#### 4. Gen *NF1*

Seizinger et al. (1987) odhalil, že se gen *NF1* nachází na 17. chromozomu. K přesné poloze genu *NF1* došly nezávisle na sobě dva týmy vedené doktorem Francisem S. Collinsem (1989) a doktorem Whitem (1987) metodou pozičního klonování. Prokázali, že se gen *NF1* nachází v oblasti 17q11.2.

Gen *NF1* pokrývá oblast 350 kb genomické DNA. Upravený transkript tohoto genu je dlouhý 11–13 kb s ORF (open reading frame) o rozsahu 8454 bp a 3,5 kb dlouhou 3' nepřekládanou oblastí. Obsahuje 60 exonů, 52 z nich je konstitutivních, zbylých 8 je alternativně sestřihováno, podle typu tkáně (viz. *Kapitola 5.1*) (Shen et al., 1996; Mo et al., 2022).

Produktem genu *NF1* je protein neurofibromin, který je přítomen ve všech buňkách organismu, nejvíce je však koncentrován v rámci buněk diferencovaných z neurální lišty, tedy v neuronech, nemyelizovaných Schwannových buňkách a oligodendrocytech, dále hlavně v dřeni nadledvin a varlatech. Široké spektrum klinických projevů NF1D souvisí s rozsáhlou produkcí neurofibrominu v různých tkáních a typech buněk. (Daston et al., 1992; Bergoug et al., 2020).

Minimální promotor *NF1* má podle luciferázové assaye velikost 470 bp, obsahuje vazebná místa pro pozitivní transkripční faktory SP1 a CREB, v nepřekládané UTR (+148 až +474 bp) se nachází vazebné místo pro represor (Zou et al., 2004).

V 35. intronu, největším z genu *NF1* (o velikosti 61 kb), se nacházejí tři geny, které jsou transkribovány z opačného vlákna: *EVI2A* (ecotropic viral integration site), *EVI2B* a *OMGP* (oligodendrocyte myelin glycoprotein). U pacientů s NF1D nebyly v těchto genech nalezeny mutace. Předpokládá se, že nemají přímý vliv na patogenezi NF1D. Jejich funkce a jejich vztah ke genu *NF1* (pravděpodobně modifikace funkce *NF1*) jsou předmětem výzkumu. *EVI2A* a *EVI2B* jsou lidskými homology myších genů *Evi-2A* a *Evi-2B* kódujících proteiny účastnící se myeloidní leukemogeneze vyvolané retrovirem. *OMGP* kóduje glykoprotein exprimovaný v oligodendrocytech (Shen et al., 1996; Bergoug et al., 2020).

Somatické mutace v *NF1* lze najít v 5–15 % lidských nádorů (Giraud et al., 2023). Mutacím je věnována *Kapitola 6*.

Přítomnost nádorů u pacientů s NF1D a identifikace somatických mutací v genu *NF1* ve sporadických nádorech, nezávislých na neurofibromatóze typu I, vedla k předpokladu, že *NF1* patří

mezi tumorsupresorové geny (TSG). Tak ho jako jeden z prvních označili Wallace et al. (1990). Tumorsupresor je označení genu (či proteinu), který za normálních okolností potlačuje proliferaci buněk. Při jeho inaktivaci vede nekontrolovaná proliferace ke vzniku nádorů. Mutace v TSG mohou být zděděné nebo získané (Mo et al., 2022). Neurofibromin je tumorsupresor, který inhibuje aktivitu proteinu Ras. Pokud dojde ke ztrátové mutaci genu *NFI*, aktivita Ras vzroste, což může vést k nádorovému bujení (Shen et al., 1996; Bergoug et al., 2020).

#### 4.1 Somatické změny genotypu *NFI* v nádorových buňkách

Pro gen *NFI* platí hypotéza dvojího zásahu (Knudson, 1971). Pacienti jsou obvykle heterozygoti, k inaktivaci wild-type alely v buňkách nádorů dochází v důsledku somatické poruchy, tzv. ztrátou heterozygosity (loss of heterozygosity, LOH) (Shen et al., 1996; Yap et al., 2014). LOH vede k absenci funkčního produktu tumorsupresorového genu v buňkách a k jejich nádorovému bujení v důsledku poruchy regulace buněčného cyklu (Tischfield, 1997).

Neurofibromy jsou tvořeny různými typy buněk, ke ztrátě obou alel genu *NFI* (vlivem germinální mutace a LOH) však dochází především ve Schwannových buňkách (Kluwe et al., 1999; Garcia-Linares et al., 2011). U keratinocytů, které tvoří většinu buněk neurofibromu, probíhá proliferace a diferenciacce velmi rychle. Je pravděpodobné, že keratinocyty se ztrátou obou alel genu *NFI* by byly rychle odstraněny (Brosseau et al., 2018).

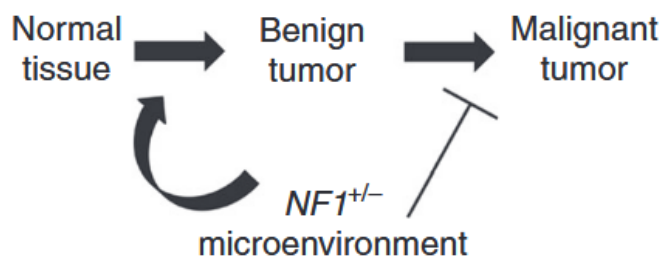
LOH byla detekována pouze u 25 % z 518 kutánních neurofibromů. Její příčinou byly z 38 % delece, ve zbylých 62 % byla příčinou mitotická rekombinace (Garcia-Linares et al. 2011).

Thomas et al. (2012) provedli detailní analýzu rozsahu LOH v genu *NFI* a čtyřech dalších tumorsupresorových genech (*TP53*, *RB*, *CDKN2A* a *PTEN*) v několika různých segmentech z deseti MPNST nádorů od pacientů s NF1D. Zjistili, že MPNST nádory obsahují obě mutované alely genu *NFI* pouze v buňkách nervového původu. Ve všech deseti nádorech detekovali LOH pro *NFI*, buňky z různých sekcí téhož nádoru se lišily rozsahem ztráty genu *NFI*. Autoři prokázali LOH i v několika dalších TSG současně. Buňky nádorů byly genotypově velmi heterogenní.

Ke ztrátě obou alel genu *NFI* dochází i v melanocytech odvozených z CLS pacientů s NF1D (De Schepper et al., 2008).

Vliv heterozygosity na projevy NF1D byl zkoumán pomocí myších modelů. U myší heterozygotních v genu *NFI* byla zvýšená frekvence benigních nádorů, ale vzácně docházelo k jejich transformaci v nádory maligní. Hypotézu o protektivní funkci heterozygotní sestavy alel *NFI* schematicky ukazuje **Obrázek č. 1** (Jacks et al., 1994; Brosseau et al., 2018).

Tato hypotéza platí specificky pro myši. Možnou příčinou odlišnosti jsou jejich modifikující geny, které by mohly heterozygotní buňky ovlivňovat jiným způsobem, než je tomu u lidí (Li et al., 2016).



**Obrázek č. 1 - Zvýšené riziko vzniku benigních nádorů u myši heterozygotních v genu *NF1*, převzato z (Brosseau et al., 2018)**

Isakson et al. (2018) připravili model NF1D u miniprasete s nonsense mutací v genu *NF1*. Schwannovy buňky a melanocyty miniprasat vykazovaly, stejně jako lidské, spontánní LOH, kterou způsobila buď genová konverze, nebo rozsáhlá delece. U kultur melanocytů odvozených z CLS byla nalezena LOH ve 4 z 8 případů, u kultur Schwannových buněk odvozených z neurofibromů v 6 z 11 případů.

## 5. Neurofibromin

Lidský neurofibromin, respektive jeho nejčastěji se vyskytující forma kódovaná mRNA s 57 exony, je protein tvořený 2818 aminokyselinami s molekulární vahou cca 250–280 kDa. Nepřesnost v údajích o váze je způsobena posttranslačními modifikacemi. Z **Obrázku č. 2** vyplývá, že se jedná o multidoménový protein tvořený:

- N-terminální doménou bohatou na cysteinové a serinové zbytky, označovanou zkratkou CSRD (cysteine-serine-rich domain),
- doménou GRD (GAP related domain), jež obsahuje i doménu vázající tubulin (TBD),
- doménou s vazebným místem pro fosfolipidy a proteiny obsažené v plazmatické membráně, SecPH
- C-terminální doménou (CTD) s NLS, jaderným lokalizačním signálem.

Přehledový článek (Mo et al., 2022) detailně popisuje všechny domény neurofibrominu a propojuje je s významnými interakcemi s dalšími proteiny. Pro oblasti genu kódující jednotlivé domény autoři využívají novou nomenklaturu, která byla zavedena Anastasaki et al. (2017).



**Obrázek č. 2 - Struktura neurofibrominu, upraveno a převzato z (Bergoug et al., 2020)**

CSRD (cysteine and serine rich domain) – červeně, GRD (GAP-related domain) – modře, TBD (tubulin binding domain) – světle modře, Sec (Sec14 homologous domain) – fialově, PH (pleckstrin homologous domain) – oranžově, CTD (C-terminal domain) – zeleně, NLS (nuclear localization signal) – modře, R1276 (argininový zbytek)

**Domény fosforylované PKA a PKC – CSRD, CTD**

**Oblasti málo strukturovaných repetitivních sekvencí a) na N-konci: 1. – 1190. AA b) na C-konci: 1852. – 2818. AA**

Čísla pod obrázkem označují polohy aminokyselin v proteinu

Doména Sec-PH je tvořena dvěma subdoménami (D'Angelo et al., 2006), Sec14, která zajišťuje interakci neurofibrominu s plazmatickou membránou (Aravind et al., 1999) a PH (pleckstrin homology), sloužící k interakci neurofibrominu např. s membránovými receptory (Bergoug et al., 2020).

Doména GRD (GAP-related domain) je významná doména neurofibrominu kódovaná exony 20-27a (dle nové nomenklatury navržené Anastasaki et al. (2017) jde o exony 27-34) genu *NF1*. Dnes je již známé, že má tato doména Ras-GAP (GTPase activating protein) aktivitu a podílí se tak na tumorsupresorové funkci neurofibrominu.

Xu et al. (1990) a souběžně Buchberg et al. (1990) prokázali, že je doména GRD homologická s katalytickou doménou proteinů kódovaných geny *IRAI/IRA2* (ze *Saccharomyces cerevisiae*) a savčího proteinu p120GAP, které interagují s proteiny Ras (Trahey & McCormick, 1987).

Biochemická analýza ukázala, že doména GRD podporuje hydrolýzu GTP vázaného na proteinu Ras, čímž protein Ras inaktivuje. Klíčovým aminokyselinovým zbytkem domény GRD je argininový zbytek (R1276) doplněný do **Obrázku č. 2**. U pacienta s NF1D byl nalezen mutovaný protein, u něhož byl arginin nahrazen prolinem. Tento protein měl 8000krát sníženou Ras-GAP aktivitu (Ballester et al., 1990; Scheffzek et al., 1998). Substituční mutace vedoucí k náhradě argininu R1276 glycinem nebo tryptofanem mohou snížit stabilitu neurofibrominu a omezit tak jeho vliv na aktivitu Ras (Thomas et al., 2012).

Neurofibromin existuje ve dvou konformacích, otevřené a uzavřené. V otevřené konformaci je neurofibromin vázán na membránu pomocí proteinu SPRED1 (viz *Kapitola 5.2.2*). To mu umožňuje vazbu na Ras prostřednictvím domény GRD a asociaci s membránou prostřednictvím domény

Sec-PH. V uzavřené konformaci stabilizované  $Zn^{2+}$  dochází k rotaci domén GRD a Sec-PH. Tyto domény jsou v uzavřené konformaci “zanořeny” do jádra proteinu a protein je neaktivní (Lupton et al., 2021; Naschberger et al., 2021).

Teprve nedávno bylo zjištěno, že neurofibromin tvoří dimery. Struktura neurofibrominového dimeru připomíná čočku. Její relativně rigidní charakter je dán propojením N- a C-terminálních konců, které obsahují repetitivní a málo strukturované domény (Lupton et al., 2021).

Většina dimerů obsahuje oba protomery v uzavřené konformaci, zatímco otevřený dimer je složen z jednoho protomeru v otevřené a druhého protomeru v uzavřené konformaci. Vazba na Ras je možná pouze prostřednictvím otevřeného protomeru (Naschberger et al., 2021).

Lupton et al. (2021) experimentálně ověřili, že missense mutace zasahující C-terminální doménu nebo mutace vedoucí k jejímu zkrácení narušují rigidní, skořápkovitou strukturu dimeru a ovlivňují rotaci GRD a Sec-PH. Fenotypovým projevem těchto mutací je zvýšení hladiny aktivní formy Ras.

Flexibilita a dimerizace neurofibrominu je pravděpodobně nezbytná k vyvolání nebo usnadnění přechodu mezi uzavřenou a otevřenou konformací a umožňuje neurofibrominu kontrolovaným způsobem regulovat signalizaci Ras (Naschberger et al., 2021).

Neurofibromin je mezi savci vysoce konzervovaný protein. Srovnání podobnosti neurofibrominu (na úrovni proteinu) u člověka a některých vybraných živočichů je zpracováno v **Tabulce č. 2**. Z té vyplývá, že neurofibromin člověka a nejpříbuznějších primátů, šimpanzů, je sekvenčně identický. Neurofibrominy dalších savců vykazují rovněž vysokou míru homologie. Podobnost neurofibrominu jednoho z hmyzích modelových organismů, *Drosophila melanogaster*, je již skokově nižší. Na gen kódující neurofibromin zjevně působí silný selekční tlak. Jeho struktura a funkce musí tedy mít klíčový význam (Bergoug et al., 2020).

Podobnost neurofibrominu	<i>Drosophila melanogaster</i>	potkan	pes	šimpanz
člověk	60%	98,5%	99,4%	100%

**Tabulka č. 2 – srovnání lidského neurofibrominu s neurofibrominem jiných živočichů, data převzata z (Bergoug et al., 2020)**

## 5.1 Izoformy neurofibrominu

U primárního transkriptu genu *NF1* může docházet k alternativnímu sestřihu, který vede ke vzniku různých izoform neurofibrominu (NF1). Alternativní sestřih může být důsledkem mutací, bylo však identifikováno několik přirozeně se vyskytujících variant, které jsou stručně charakterizovány v **Tabulce č. 3** (Barron & Lou, 2012).

Alternativní exon /doména	Počet vložených aminokyselin	Lokalizace exprese	Funkce izoformy	Zdroje
<b>Inzerce alternativního exonu bez změny ORF</b>				
<b>9a/b</b>	10	CNS	Účast v paměti a mechanismech učení	(Danglot et al., 1995)
<b>10a-2</b>	15	Většina lidských tkání	Nejasná	(Kaufmann et al., 2002)
<b>23a GRD</b>	21	Většina lidských tkání, výjma CNS	Snížení Ras-GAP aktivity	(Barron & Lou, 2012)
<b>48a CTD</b>	18	Srdeční a kosterní svalová tkáň	Role ve vývoji srdeční a kosterní svalové tkáně	(Gutmann et al., 1994; Yap et al., 2014)
<b>Absence exonu</b>				
<b>43<sup>-</sup> CTD</b>	0	Placentární tkáň, játra, kosterní svalstvo, ledviny	Postrádá NLS, porucha regulace transportu NF1 do jádra	(Vandenbroucke et al., 2002)
<b>29<sup>-</sup> PH</b>	0	Mozek	Nejasná	(Park et al., 1998)
<b>29<sup>-</sup>/30<sup>-</sup> PH</b>	0	Všechny tkáně, v srdci a játrech méně	Nejasná	(Park et al., 1998)
<b>30<sup>-</sup></b>	0	Všechny tkáně, nevyskytuje se v krvi	Nejasná	(Park et al., 1998)

**Tabulka č. 3 – Přehled alternativních exonů v *NF1*-mRNA**

\* dle nové nomenklatury: exon 9a/b = 11alt12, exon 10a-2 = 12alt13, exon 23a = 30alt31, exon 48a = 56alt57, exon 43 = 51, exon 29 = 37, exon 29/30 = 37alt38, exon 30 = 38 (Anastasaki et al., 2017)

Exon 23a se nachází v oblasti genu, která kóduje neurofibrominovou doménu GRD a je alternativně sestřihován specifickým způsobem v závislosti na tkáni, v níž je exprimován. Izoforma proteinu (dále označována jako izoforma II), odvozená od mRNA s exonem 23a, má zhruba desetkrát slabší schopnost regulace signalizace Ras než ta, v níž je tento exon vynechán. Přidává totiž bazické aminokyseliny, které významně mění strukturu GRD, čímž oslabují schopnost regulovat Ras. Tato izoforma je u člověka obvykle exprimována ve většině tkání, zatímco v neuronech CNS je spíše vynechána (Barron & Lou, 2012).

Myši s delecí exonu 23a jsou životaschopné a nejeví zvýšenou predispozici ke vzniku nádorů, objevují se u nich však poruchy učení (Costa et al., 2001). Assunto et al. (2019) analýzou exprese *NFI* v leukocytech 138 pacientů zjistili, že frekvence neurofibromů nebyla korelována s hladinou izoformy I.

Izoformy I (2818 aminokyselin) i II (2839 aminokyselin) byly nalezeny i u jiných obratlovců, některé z alternativně sestřihovaných variant jsou tedy evolučně vysoce konzervované (Bergoug et al., 2020).

Izoforma neurofibrominu obsahující exon 10a-2 zahrnuje navíc transmembránový segment, což vede k její lokalizaci v intracelulárních membránách. Její přítomnost byla potvrzena v membránách endoplazmatického retikula. Na izoformu na membráně se přes doménu GRD váže i Ras s navázaným GTP. Tato interakce je však závislá na konformaci neurofibrominu nebo modifikujících proteinech. Izoforma zahrnující exon 10a-2 může díky své lokalizaci hrát roli v regulaci buněčné signalizace. Hladina této izoformy je ve srovnání s wild-type (WT) mRNA velice nízká (Báez-Flores et al., 2023; Kaufmann et al., 2002).

Její funkce nikdy nebyla potvrzena, jelikož se jí od studie z roku 2002 doposud nikdo hlouběji nezabýval. Její autor ji pravděpodobně přisuzuje významnější funkci, než vyplývá z pozdějších studií.

Izoforma 43<sup>-</sup> se v nízké míře vyskytuje v tkáních nervových, což naznačuje, že je jaderná lokalizace NF1 v buňkách těchto tkání podstatná (Vandenbroucke et al., 2002).

Pomocí RT-PCR byl detekován alternativní sestřih exonů 29 a 30. Byly identifikovány tři izoformy, 29<sup>-</sup>, 30<sup>-</sup> a 29<sup>-</sup>/30<sup>-</sup> (mRNA s vynechaným exonem 29, 30 nebo s absencí obou exonů). Všechny tři izoformy jsou zkráceny předčasným vložením stop kodonu. Isoformy 29<sup>-</sup> a 29<sup>-</sup>/30<sup>-</sup> mají normální čtecí rámec zachovaný až po AK č. 1735, následují čtyři alternativní kodony a stop kodon. Izoforma 30<sup>-</sup> má čtecí rámec zachován po AK č. 1849, následuje jeden alternativní kodon a následně stop kodon (Park et al., 1998).

## 5.2 Interakční partneři neurofibrominu

Interakční partneři neurofibrominu představují široké spektrum molekul, které ovlivňují jeho funkci, hladinu, aktivitu a lokalizaci v rámci buňky. Mezi těmito partnery nalezneme jak proteiny, tak RNA, jejichž vzájemné působení může významně přispívat k rozdílům ve fenotypovém projevu pacientů s NF1D, přestože mohou sdílet stejnou mutaci v genu *NFI*. V závislosti na ontogenetickém vývoji a typu tkáně se přítomnost interakčních partnerů v buňce liší a i vliv snížené hladiny neurofibrominu může vyvolat různé změny fenotypu.

## 5.2.1 Vliv posttranslačních modifikací na funkci neurofibrominu

Tato podkapitola se zaměřuje na první z významných faktorů, který může neurofibromin v mnoha aspektech značně ovlivnit – posttranslační modifikace.

Ras-GAP aktivita proteinu je ovlivněna fosforylací domén CSRD a CTD. Fosforylace serinových zbytků v doméně CSRD  $\alpha$  izoformou proteinkinázy C (PKC- $\alpha$ ) usnadňuje interakci neurofibrominu s aktinovým cytoskeletem, což posiluje jeho Ras-GAP aktivitu. Fosforylace je vyšší u nediferencovaných než u diferencovaných neuronů (Mangoura et al., 2006). Naopak fosforylace proteinkinázou A (PKA) v doménách CSRD a CTD vede k interakci s proteiny 14-3-3 (konzervované proteiny regulující přenos intracelulárních signálů v eukaryotických buňkách), což způsobuje snížení Ras-GAP aktivity (Feng et al., 2004).

DDAH (Dimethylarginin dimethylaminohydroláza-1) je buněčný protein, který se váže na domény CSRD a CTD neurofibrominu. DDAH zvyšuje přístupnost NF1 pro fosforylaci kinázou PKA (Tokuo et al., 2001).

Fosforylace pomocí PKC- $\epsilon$  v oblasti CTD (Ser2808) umožňuje expozici NLS na povrchu neurofibrominu, připojení proteinu ke komplexu jaderných pórů a translokaci do jádra. Fosforylace pomocí PKC je závislá na buněčném cyklu, nejvíce k ní dochází v G2 fázi (Koliou et al., 2016).

K maximální aktivaci Ras je nutná ubiquitinace NF1 (Cichowski et al., 2003). Vazba růstových faktorů na membránové receptory aktivuje izoformu PKC- $\alpha$ . Za těchto podmínek je NF1 velmi rychle ubiquitinylován a následně degradován v proteazomu. Vliv PKC- $\alpha$  na hladinu NF1 a jeho aktivitu je tedy závislý na přítomnosti dalších proteinů. Krátce po jeho degradaci je jeho hladina opět zvýšena, aby mohlo dojít ke snížení aktivity proteinu Ras. PKC- $\alpha$  tak reguluje amplitudu a trvání signálů aktivovaných Ras tím, že podporuje degradaci neurofibrominu (McGillicuddy et al., 2009).

Sumoylace je nově objasněná posttranslační modifikace týkající se Sec-PH domény, konkrétně dvou lysinů na pozicích K1634 a K1731. Zvyšuje stabilitu neurofibrominu a jeho Ras-GAP aktivitu (Bergoug et al., 2024).

V **Tabulce č. 4** jsou stručně charakterizovány hlavní cytosolické regulátory neurofibrominu. Ty z nich, které souvisí s kognitivními poruchami a představují potenciální terapeutické cíle při léčbě, jsou posléze popsány o něco podrobněji.

Regulátor	Mechanismus účinku	Vliv na neurofibromin	Zdroje
<b>PKC (1)</b>	Fosforylace serinových zbytků v doméně CSRD	Interakce NF1 s aktinovým cytoskeletem, posílení Ras-GAP aktivity	(Mangoura et al., 2006)
<b>PKC (2)</b>	Fosforylace Ser2808 v doméně CTD	Expozice NLS na povrchu NF1, translokace do jádra, interakce s dělicím vřeténkem, prevence nondisjunkce chromozomů	(Koliou et al., 2016)
<b>PKA</b>	Fosforylace neurofibrominu v doménách CSRD a CTD	Interakce s proteiny 14-3-3 vedoucí ke snížení Ras-GAP aktivity	(Feng et al., 2004)
<b>14-3-3 proteiny</b>	PKA dependentní vazba na fosforylovanou doménu CTD	Snížení Ras-GAP aktivity	(Feng et al., 2004)
<b>DDAH1*</b>	Uspadnění fosforylace domén CSRD a CTD prostřednictvím PKA	Snížení Ras-GAP aktivity	(Tokuo et al., 2001)
<b>SPRED1*</b>	Neurofibromin s navázaným SPRED1 se váže na plazmatickou membránu.	Inhibice Ras (u nádorových buněk fosforylace na Ser105 proteinu SPRED1 (Ser105) redukuje interakci s NF1)	(Stowe et al., 2012; Yan et al., 2020)
<b>ALK*</b>	Aktivace neurofibrominem regulované dráhy Ras	Snížení aktivity ALK kompenzuje absenci NF1	(Mo et al., 2022)
<b>STAT3*</b>	STAT3 tlumí aktivitu neurofibrominu, má význam v tumorigenezi	Delece <i>STAT3</i> snížila počet nádorů u pacientů s NF1D	(Wu et al., 2016; Báez-Flores et al., 2023)
<b>GPCR*</b>	$\beta$ a $\gamma$ podjednotky receptorů spřažených s G-proteiny se vážou na neurofibromin ve striatálních neuronech	Inhibice neurofibrominu	(Xie et al., 2016; Mo et al., 2022)
<b>Ubiquitin ligázy</b>	Růstové faktory aktivují PKC, ta indukuje ubiquitinaci a degradaci neurofibrominu v proteasomu	Snížení hladiny NF1, aktivace Ras	(Cichowski et al., 2003; McGillicuddy et al., 2009)
<b>miRNA</b>	Neurofibromin je negativně regulován prostřednictvím miR-27b-3p a miR-27a-3p	Snížení hladiny NF1, potenciální využití miRNA jako biomarkery pro diagnostiku a inhibitorů miRNA pro léčbu NF1D	(Lu et al., 2021)

**Tabulka č. 4 – Regulace aktivity a stability NF1**

\* DDAH1 - Dimethylarginin dimethylaminohydroláza-1

\* SPRED1 - Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1, Protein 1, příbuzný Sprouty, obsahující doménu EVH1

\* STAT3 – Signal transducer and activator of transcription 3, přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3

\* ALK – Anaplastic lymphoma kinase, kináza anaplastického lymfomu

\* GPCR – G-protein coupled receptor, receptor spřažený s G-proteinem

Gouzi et al. (2011) zjistili, že zvýšená aktivita kinázy ALK v neuronech u *Drosophila melanogaster* má negativní vliv na schopnost učení, podobně jako delece *NF1* u pacientů s NF1D. Snížení aktivity ALK vedlo k nárůstu tělesné velikosti i ke zlepšené schopnosti učení u myšičího modelu NF1D (Weiss et al., 2017).

Metodou inzerční mutagenese bylo zjištěno, že signální dráha JAK-STAT hraje klíčovou roli ve vzniku benigních neurofibromů. STAT3 nepřímo aktivuje signální molekulu  $\beta$ -katenin, ta je translokována do jádra a spouští transkripci genů vedoucí k proliferaci buněk a růstu neurofibromů. STAT3 dále zvyšuje aktivitu  $\beta$ -kateninu tím, že inhibuje Gsk3 $\beta$  a Arid1b rozkládající  $\beta$ -katenin (Wu et al., 2016).

Lidské i myšičí buňky s mutací v genu *NF1* jsou výrazně citlivější než buňky nemutované na léčbu inhibítorem signální dráhy JAK2/STAT3. Vzhledem k tomu, že cílené terapie zaměřené na  $\beta$ -katenin dosud nejsou ověřené, může být inhibice STAT3 vhodnou terapií (Wu et al., 2016).

## 5.2.2 Lokalizace neurofibrominu a interakce s cytoskeletem

Lokalizace neurofibrominu v buňce je úzce spojena s jeho funkcí a může být závislá na cytoskeletu. Původně se o neurofibrominu uvažovalo jako o cytosolickém proteinu, dnes je však již známo, že se může vyskytovat v mnoha buněčných kompartmentech.

V plazmatické membráně se NF1 může vyskytovat např. prostřednictvím interakce s proteinem SPRED1 (viz **Tabulka č. 4**) (Stowe et al., 2012).

Během embryonálního vývoje neurofibromin interaguje s proteiny cytoskeletu. V rané embryonální fázi se v nediferencovaných neuronech NF1 váže na aktinová mikrofilamenta. V další etapě diferenciaci NF1 kolokalizuje s tubulinem, především v oblasti centrozomu (Li et al., 2001).

LIMK2 je členem signální dráhy Rho/ROCK/LIMK2/kofilin. LIMK2 fosforyluje kofilin, čímž mu zabrání depolymerizovat aktin. To vede k agregaci aktinu a tvorbě stresových vláken. Ozawa et al. (2005) zjistili, že neurofibromin je inhibítorem této dráhy (viz **Obrázek č. 4** vlevo dole, str. 17) Vallée et al. (2012) upřesnili, že k inhibici dochází prostřednictvím domény SecPH, která naruší schopnost kinázy LIMK2 fosforylovat kofilin.

Syndekany jsou transmembránové glykoproteiny, které ovlivňují buněčnou migraci a adhezi. V mozku myšičí i člověka NF1 interaguje s intracelulární doménou dimerizovaného syndekanu-2, jejich interakce aktivuje PKA a tím umožňuje tvorbu filopodií. Syndekan-2 zprostředkuje i interakci NF1 s proteinkinázou CASK (Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin dependentní serinová proteinkináza), která je podstatná pro maturaci synapsí (viz **Obrázek č. 4**, vlevo nahoře). Vznik těchto struktur výrazně ovlivňuje učení.

Poškození interakce NF1, PKA a CASK, ke kterému dochází u pacientů s NF1D, je pravděpodobnou příčinou poruch jejich kognitivních funkcí (Volta et al., 2010; Hu et al., 2016).

U heterozygotních *NF1*<sup>+/-</sup> myší lze pozorovat sníženou hustotu dendritických trnů, která je spojena s kognitivními poruchami, nižší zvědavostí, sníženou intenzitou sociálního chování a zvýšeným strachem. Shih et al. (2020) prokázali, že zvýšená exprese genu *VCP* nebo zvýšení koncentrace leucinu v potravě zvyšují proteosyntézu na ER, způsobují zvýšení hustoty dendritických trnů a normalizaci chování.

Protein NF1 zajišťuje interakci VCP s ER a zvýšení proteosyntézy. U heterozygotních myší ER neexpanduje ze soma neuronu do dendritů, zvýšená exprese VCP vede k rozvoji ER a proteosyntézy i v oblasti dendritů. Aktivaci proteosyntézy lze inhibovat rapamycinem. Pokud VCP není přítomen, na synaptické šterbině neuronů je snížený počet iontových kanálů (Shih & Hsueh, 2016).

Význam proteinu VCP pro normální vývoj nervové soustavy potvrzují nálezy demence, amyolaterální sklerózy nebo poruch autistického spektra způsobených mutacemi v genu *VCP* (Wang et al., 2011).

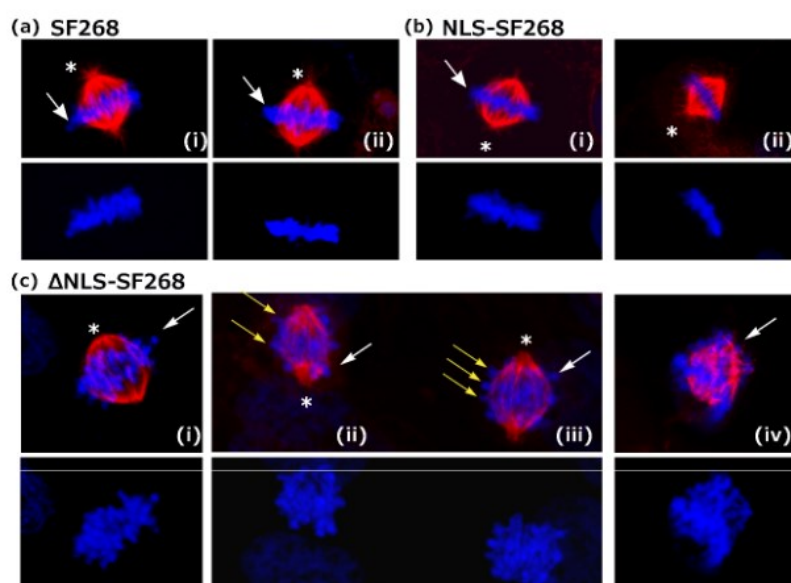
Mitochondriální proteiny účastníci se produkce ATP jsou obzvláště citlivé na nedostatek NF1 i na zvýšení koncentrace leucinu. Pokles v mitochondriální aktivitě, transportu proteinů a molekulách cytoskeletu naruší synaptickou odpověď na podněty. Dlouhodobá paměť je narušena, protože *NF1*<sup>+/-</sup> neurony nejsou schopny vyvolat efektivní proteosyntézu vyžadovanou k synaptické remodelaci a odpovědi (Shih et al., 2020).

Kaveolin je transmembránový protein vytvářející kaveolinové domény, v nichž dochází k interakci mnoha proteinů se signální funkcí, včetně Ras, ERK a FAK (fokální adhezivní kináza). Boyanapalli et al. (2006) prokázali interakci kaveolinu s NF1 v mozku myší, potkanů i člověka. Vazebná místa pro kaveolin byla nalezena v doméně SecPH proteinu NF1. Missense mutace *NF1* ve třech potenciálních vazebných místech pro kaveolin byly detekovány u pacientů s NF1D. Zjistili také, že myší embryonální fibroblasty (MEF) s absencí NF1 rostou pomaleji a mají výrazně narušenou síť aktinových mikrofilament s fosforylovanou FAK, jejíž přítomnost je typická pro stresová aktinová vlákna. Snížení koncentrace cholesterolu v cytoplazmatické membráně způsobuje destrukci kaveolinových domén. U MEF s absencí NF1 byla hladina fosforylovaných proteinů ERK a AKT stimulujících proliferaci výrazně nižší u buněk s nízkou hladinou cholesterolu než u buněk s normální hladinou cholesterolu. Regulace hladiny cholesterolu, např. pomocí statinu, by mohla snížit tvorbu neurofibromů u pacientů s NF1D (Boyanapalli et al., 2006).

Epiteliálně-mesenchymální transice, která umožňuje vznik MPNST nádorů, je rovněž závislá na přítomnosti kaveolinu a NF1, který ho stabilizuje. V buňkách MPNST je zvýšená hladina RNA vazebného Musashiho proteinu (MSI2), který stimuluje degradaci kaveolinu v proteazomu. Snížením hladiny MSI2 lze stabilizovat hladinu kaveolinu a zabránit vzniku MPNST u pacientů s NF1D (Yang et al., 2020).

Koivunen et al. (2000) jako první pozorovali neurofibromin v jádře keratinocytů. V interfázi se váže na jaderné laminy A a C, od G2 fáze je lokalizován na centrozomech a během dělení jádra interaguje s mikrotubuly dělicího vřeténka. V metafázi zajišťuje uspořádání chromozomů v ekvatoriální rovině. Po rozdělení jádra se váže na centrální mikrotubuly a podílí se na rozdělení buňky (Koliou et al., 2016; Peta et al., 2020).

**Obrázek č. 3** ukazuje rozdíl mezi buňkami obsahujícími neurofibromin s funkčním NLS a bez něj ( $\Delta$ NLS). Buňky s  $\Delta$ NLS (část c) mají vyšší hustotu cytosolických mikrotubulů, zároveň však dochází ke ztrátě jejich vzájemných vazeb a vzniku dělicích vřetének bez astrálních mikrotubulů. Poškození dělicího vřeténka narušuje segregaci chromozomů, což může vést k aneuploidii a nádorové transformaci (Peta et al., 2020).



**Obrázek č. 3 - Interakce neurofibrominu s dělicím vřeténkem, převzato z (Peta et al., 2020)**

buněčné linie glioblastomu, které: (a), (b) obsahují NLS, (c) neobsahují NLS  
červeně -  $\beta$ -tubulin, modře – chromatin, bílé šipky – ekvatoriální rovina dělicího vřeténka, žluté šipky – abnormální lokalizace chromozomů,  
hvězdičky – astrální mikrotubuly  
římské číslice označují jednotlivá dělicí vřeténka

Přítomnost NF1 v jádře také umožňuje interakci s estrogenovým receptorem (viz *Kapitola 5.2.3*) (Cao et al., 2015).

### 5.2.3 Signální dráhy ovlivněné neurofibrominem

Množství signálních drah závislých na neurofibrominu a jejich složitost přesahuje cíle práce a její rozsah. Detailněji a komplexněji jsou signální dráhy spjaté s NF1 popsány v přehledových člancích Mo et al. (2022) či Báez-Flores et al. (2023).

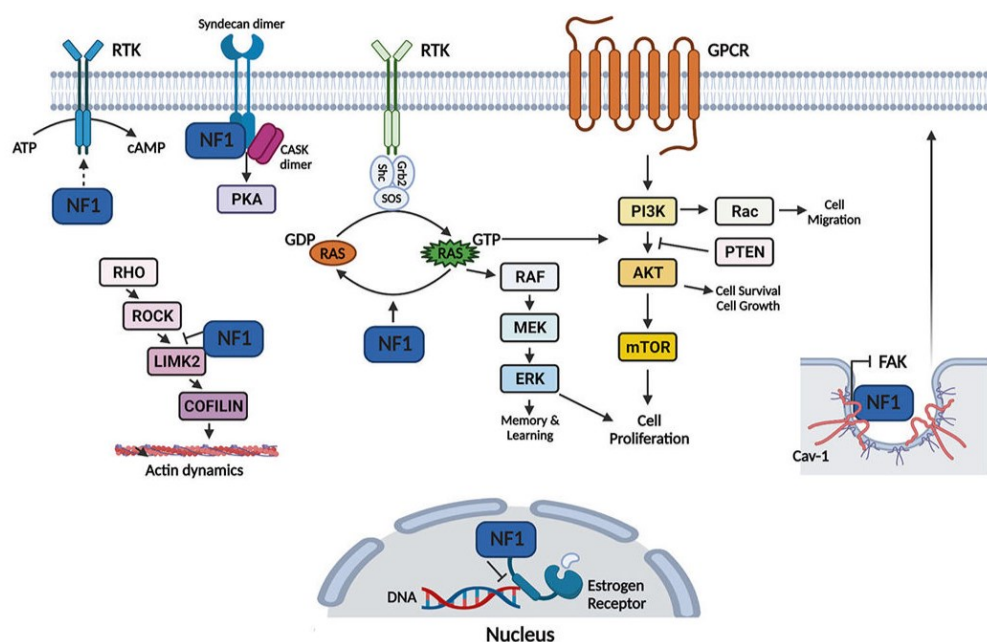
Neurofibromin interaguje s velkým množstvím proteinů a signálních drah, čímž ovlivňuje proliferaci i diferenciaci buněk. Mutace či porucha regulace *NF1* vede ke zvýšené přítomnosti Ras s navázaným GTP, který stimuluje aktivitu dalších klíčových signálních drah, které tak NF1 nepřímo ovlivňuje (Mo et al., 2022). Ty nejpodstatnější jsou shrnuty v **Tabulce č. 5**.

Signální dráha	Mechanismus účinku	Vliv na proliferaci	Zdroje
<b>Ras</b>	Neurofibromin urychluje konverzi Ras-GTP na neaktivní Ras-GDP	Negativní regulace Ras-dependentní proliferace a diferenciaci	(Ballester et al., 1989; Shen et al., 1996)
<b>Raf/MEK*/ERK*</b>	V buňkách s mutovaným NF1 dochází k nadměrné aktivaci této dráhy prostřednictvím Ras	Aktivace dráhy stimuluje buněčnou proliferaci a přispívá tumorigenezi	(Mo et al., 2022)
<b>PI3K*/AKT*/mTOR*</b>	V neurofibromech je mTOR trvale aktivní, neboť Ras a PI3K aktivují AKT, který inaktivuje tuberin – inhibitor mTOR	Aktivace dráhy stimuluje buněčnou proliferaci a přispívá k tumorigenezi	(Johannessen et al., 2005; Mo et al., 2022)
<b>cAMP/PKA</b>	Neurofibromin aktivuje adenylátcyklázu, což vede ke zvýšení hladiny cAMP a aktivaci PKA	Aktivace dráhy cAMP/PKA vede k inhibici buněčného růstu, indukci apoptózy, modulaci aktinového cytoskeletu atd.	(Dasgupta et al., 2003; Brown et al., 2012)
<b>Související s ESREC</b>	Vazba neurofibrominu na ESREC v jádře pomocí ligand-vazebné domény ER a oblastí NF1 bohatých na leucin	Funkční neurofibromin inhibuje proliferaci buněk indukovanou estrogeny (nefunkční NF1 naopak)	(Cao et al., 2015; Dischinger et al., 2018)

**Tabulka č. 5 – Signální dráhy závislé na neurofibrominu**

- \* MEK (MAP2K) - kináza proteinkinázy aktivované mitogenem
- \* ERK - kináza regulovaná extracelulárním signálem
- \* PI3K - Fosfatidylinositol-3-kináza
- \* AKT (PKB) - proteinkináza B
- \* mTOR - savčí serin/threoninová kináza inhibovaná rapamycinem
- \* ESREC - estrogenový receptor

**Obrázek č. 4** poskytuje zjednodušené schéma některých signálních drah, kterých se neurofibromin účastní. Více popsány jsou zejména ty, která mají potenciál pro léčbu NF1D.



**Obrázek č. 4 – Zjednodušené schéma signálních drah, jichž se neurofibromin účastní, převzato z (Mo et al, 2022)**

Tyrosinkinázové receptory (RTK) stimulují adaptorové proteiny, což vede k aktivaci Ras, která umožní aktivaci drah zodpovědných za proliferaci a přežití buněk, včetně Raf/MEK/ERK a PI3K/AKT/mTOR. Mnoho RTK má podíl na patogenezi NF1D. Např. nadměrná hladina MET (receptor hepatocytárního růstového faktoru) a jeho ligandu – hepatocytárního růstového faktoru, byla prokázána v neurofibromech i MPNST, což vedlo k zvýšenému růstu nádorů a metastázování (Brosseau et al., 2020).

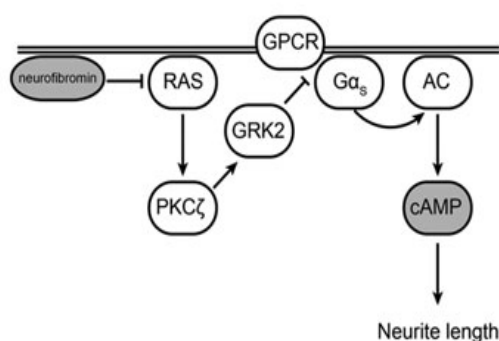
Inhibitory RTK nebo proteinů signálních drah Raf/MEK/ERK a PI3K/AKT/mTOR lze využít při léčbě NF1D. Selumetinib, inhibitor MEK, se stal prvním schváleným léčivem pro neoperovatelné plexiformní neurofibromy (Gross et al., 2020).

U pacientů s NF1D je narušena aktivita neuronů i vývoj nervové soustavy v důsledku změn aktivity adenylátcyklázy.

Hannan et al. (2006) popsali dva způsoby aktivace adenylátcyklázy závislé na neurofibrominu v mozku drozofil. Na rozdíl od mozku u myši a člověka, protein Ras měl po aktivaci receptoru EGFR pozitivní vliv na aktivitu adenylátcyklázy a hladinu cAMP. Stimulace adenylátcyklázy byla závislá na funkční GRD doméně NF1.

Při aktivaci GPCR serotoninem u drozofil, myši i člověka se uplatňuje interakce receptoru s PH doménou NF1, která umožňuje chronickou aktivaci adenylátcyklázy. Tato dráha je nezávislá na proteinu Ras (Hannan et al., 2006).

Anastasaki & Gutmann (2014) sledovali vliv neurofibrominu a Ras na aktivitu adenylátcyklázy v neuronech u myši a člověka. Zjistili, že protein Ras má negativní vliv na aktivitu adenylátcyklázy, a podrobně popsali mechanismus, jak zvýšená aktivita Ras u pacientů s NF1D způsobuje pokles hladiny cAMP. Tento mechanismus schématicky popisuje **Obrázek č. 5**.



**Obrázek č. 5 – Schéma regulace hladiny cAMP ovlivněné neurofibrominem a Ras v neuronech CNS, převzato z (Anastasaki & Gutmann, 2014)**

Snížená hladina cAMP vedoucí k poklesu aktivity PKA v prefrontální kůře mozku u pacientů s NF1D by mohla být příčinou jejich kognitivních poruch (Deraredj Nadim et al., 2016; Mo et al., 2022).

Aktivovaný ESREC (estrogenový receptor) vede k proliferaci buněk neuroblastomů a zvyšuje transkripční aktivitu estrogenového transkripčního faktoru. ESREC je proto potenciálním terapeutickým cílem pro léčbu lidských neuroblastomů (Cao et al., 2015).

Dzieran et al. (2018) ve své studii došli k odlišným závěrům. Zjistili, že v buňkách neurofibromů s amplifikovaným genem *MYCN* je zvýšená exprese specifických microRNA (např. miR-18A), které snižují aktivitu ESREC i dalších jaderně lokalizovaných receptorů. Je-li inhibována exprese miR-18A nebo je zajištěna zvýšená exprese ESREC, lze obnovit diferenciaci neuronů heterozygotních v *NF1* s amplifikovanými *MYCN* a výrazně snížit riziko maligní transformace (Ribeiro et al., 2016).

## 6. Mutace spojené s neurofibromatózou typu I

NF1D je dědičné onemocnění s nejvyšší mutační rychlostí, přibližně u 50 % pacientů je příčinou nemoci mutace *de novo* (Pacot et al., 2024a). Screening mutací v genu *NF1* komplikují jeho velikost, přítomnost mutací po celé jeho délce prakticky rovnoměrně, bez mutačních hotspotů, a také existence pseudogenů (Shen et al., 1996).

V genu *NF1* bylo podle databáze ClinVar identifikováno 4325 intragenních patogenních germinálních mutací. Kompletní delece genu *NF1* se vyskytuje u cca 4 % pacientů trpících NF1D a vede k závažné formě této choroby, charakterizované především velkým množstvím benigních nádorů (PNF i CNF), větším rizikem malignit, obličejovými malformacemi a kognitivními poruchami (Tonsgard et al., 1997; De Luca et al., 2007; Napolitano et al., 2022).

I přes velké množství identifikovaných mutací není dodnes jasná korelace mezi genotypem a fenotypem NF1D. (Scala et al., 2021), Napolitano et al. (2022), Ho et al. (2022) a Gjorgjievska et al. (2023) ve svých studiích zkoumali vztah mezi typem mutace v genu *NF1* a fenotypovými projevy u vybraného souboru z národní databáze pacientů. Je třeba podotknout, že se studie lišily počtem pacientů a v některých případech i definicí daného fenotypu. I přesto se všechny čtyři studie shodly na následujících závěrech a konkrétních korelacích mezi genotypem a fenotypem:

U většiny pacientů s NF1D je v germinální mutované alele přítomna mutace, která vede k předčasnému ukončení translace a tedy ke zkrácení proteinu. Zpravidla se jedná o non-sense substituční mutace, posunové mutace a mutace ovlivňující sestřih pre-mRNA. Ne všechny sestřihové mutace však vedou ke zkrácení proteinu (Ho et al., 2022; Napolitano et al., 2022; Gjorgjievska et al., 2023). U pacientů se zkrácenou formou neurofibrominu nebo s jeho sníženou hladinou se obecně častěji objevují závažnější fenotypy. Charakteristické změny fenotypu se objevují dříve než u ostatních pacientů (Gjorgjievska et al., 2023).

Ochranou před vznikem zkrácených variant je mechanismus NMD (nonsense mediated mRNA decay) vedoucí k degradaci defektní mRNA, která obsahuje předčasný stop kodon (Scala et al., 2021).

Li et al. (2016) analyzovali množství mutantní a wild-type mRNA u heterozygotních myší s cílem ověřit vliv NMD. V případě absence NMD by měl být poměr mRNA z obou alel 50:50, došli však k poměru 9:91 ve prospěch WT mRNA. NMD tedy skutečně probíhá i u myší.

Další shoda se týká mikroleceí, které vznikají nealelickou homologní rekombinací mezi sekvencemi o nízkém počtu opakování v blízkosti genu *NF1*. Ve všech studiích se mikrolece vyskytovaly přibližně v 5–10 % případů (Sabbagh et al., 2013; Ho et al., 2022). Mikrolece typu 1

(70–80 % všech mikrodelecí u NF1D) s rozsahem 1,4 Mbp zasahují 14 kódujících genů. Mikrodelece typu 2 (10–20 %) zasahují 13 genů a 1,2 Mbp (Ho et al., 2022). Oba typy mikrodelecí obsahují další tumorsupresorové geny (Scala et al., 2021).

Pacienti s mikrodelecemi typu 1 mají riziko vzniku MPNST cca 16–26 %, u ostatních pacientů s NF1D je riziko 8–16 %. Navíc jsou mikrodelece typu 1 spjaty s vývojem velkého množství plexiformních, subkutánních i spinálních neurofibromů již před obdobím puberty (Kehrer-Sawatzki & Cooper, 2021; Garzon et al., 2024).

Ztráta dvou významných modifikujících genů vlivem mikrodelecí typu 1 u pacientů s NF1D vede k závažnějším fenotypům. Gen *SUZ12* (supresor proteinu Zeste 12) kóduje protein, který je součástí represivního komplexu Polycomb 2. Ten se podílí na metylaci histonů, což vede k utlumení genové exprese. Ztráta obou funkčních alel genu *SUZ12* podmiňuje vývoj MPNST (Pasini et al., 2010; De Raedt et al., 2014; Kehrer-Sawatzki & Cooper, 2021).

Gen *CRLF3* (“Cytokine receptor-like factor 3 gene”) kóduje protein, který negativně reguluje vstup do S fáze buněčného cyklu. Neurální buňky s mikrodelecemi zasahujícími gen *CRLF3* mají narušenu maturaci neuronů. U dětí se ztrátou jedné kopie genu *CRLF3* se často vyskytují poruchy autistického spektra (ASD) (De Raedt et al., 2014; Kehrer-Sawatzki & Cooper, 2021).

Garzon et al. (2024) analyzovali 57 osob s mikrodelečním syndromem NF1D: u 44 % našli pleximorfni nádory, pouze u 5 % MPNST. U 80 % byly zjištěny opožděný vývoj a problémy s učením a u 55 % psychické problémy.

Missense mutace mohou způsobit mírné i závažné fenotypové projevy NF1D. Jen u některých byl vysvětlen vliv na vlastnosti neurofibrominu a fenotyp pacienta.

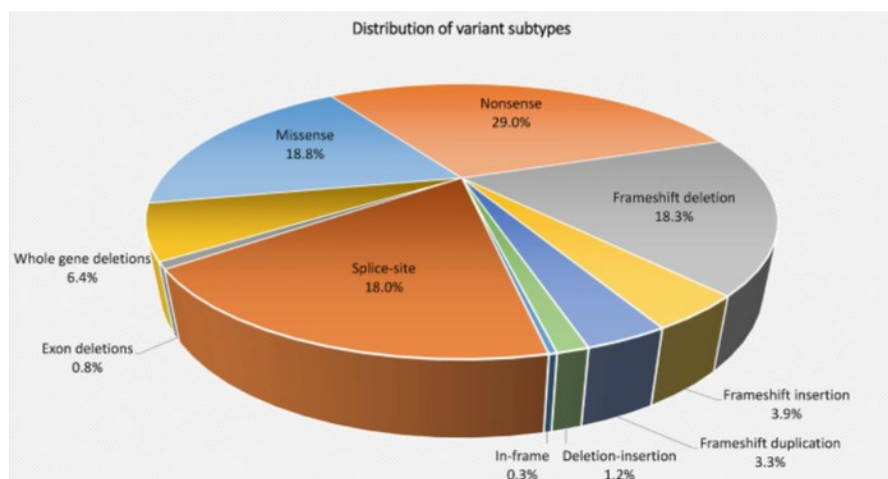
Missense mutace postihující oblast neurofibrominu mezi AK 844–848 vedou k závažným fenotypům s velkým množstvím velkých plexiformních a spinálních neurofibromů. V přítomnosti těchto či jiných destabilizujících substitucí se předpokládá, že celková hladina neurofibrominu bude nižší kvůli dominantně negativnímu efektu mutovaného neurofibrominu. U heterozygotů mají heterodimery tvořené WT a mutovaným NF1 sníženou stabilitu. Pokles koncentrace NF1 vede ke zvýšení aktivity Ras a tumorigenezi (Ho et al., 2022; Napolitano et al., 2022; Young et al., 2023).

Missense mutace (M1149, R1276, K1423) jsou spojené s příznaky podobnými syndromu Noonanové (obličejové malformace, kardiovaskulární abnormality aj.) (Koczkowska et al., 2020; Ho et al., 2022; Napolitano et al., 2022; Han et al., 2024).

Ke germinálním mutacím *NF1*, které nezpůsobují zkrácení proteinu, patří i inserce a delece malého rozsahu, které nemění ORF. Delece 3 bp v 17. exonu vede ke ztrátě jednoho ze dvou

methioninových zbytků (991 či 992) neurofibrominu. Pacienti s touto mutací vykazují mírnější fenotyp NF1D charakterizovaný absencí kutánních i plexiformních neurofibromů (Upadhyaya et al., 2007).

Příklad zastoupení jednotlivých typů germinálních mutací u pacientů s NF1D poskytuje rozsáhlá analýza souboru 644 pacientů, u nichž byla potvrzena diagnóza NF1D (**Graf č. 1**). 72 % mutací vedlo ke zkrácení proteinu, u 6,4 % pacientů byla zjištěna delece celého genu. Celkem objevili 141 nových (dosud nepopsaných) mutací (Ho et al., 2022).



**Graf č. 1 – Klasifikace mutací a jejich zastoupení ve studii Ho et al. (2022)**

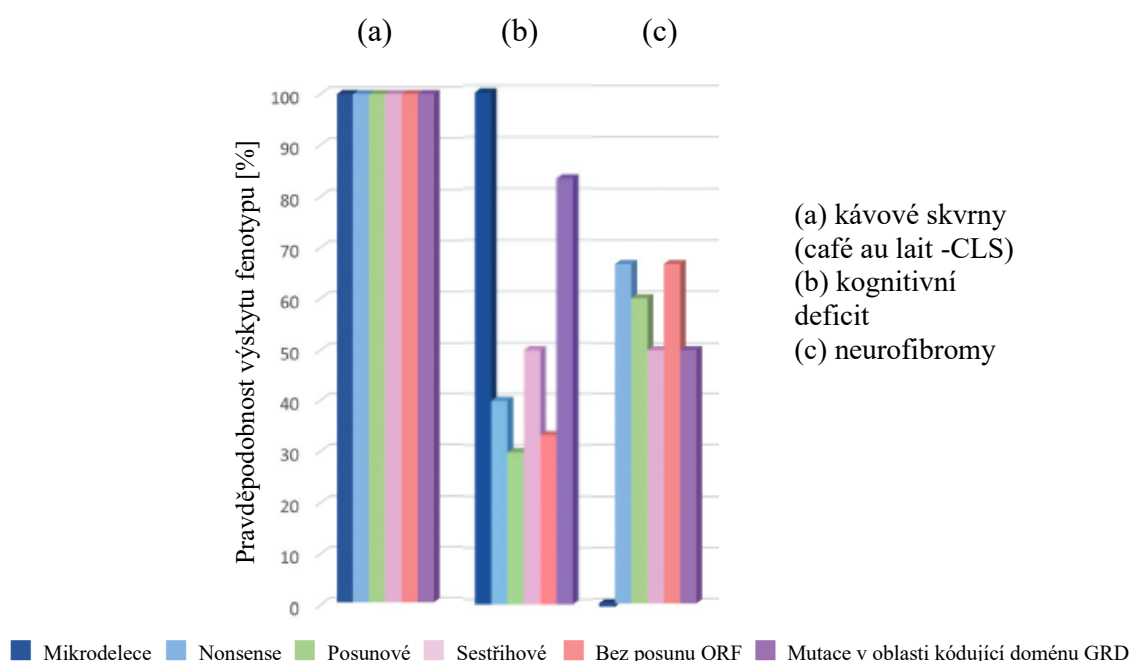
Mutace v genu *NFI* se vyskytují v 5–15 % sporadických nádorů, které nejsou spojeny s NF1D, nejvíce v případě melanomů, myeloidní leukémie a plicních adenokarcinomů (Giraud et al., 2023). Dle databáze COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) bylo doposud v lidských nádorech identifikováno 4698 somatických mutací v genu *NFI* v 6227 vzorcích nádorů, což je 7 % všech testovaných vzorků. Nejčastěji se jednalo o missense mutace (31 %), nonsense (17 %) a posunové mutace (12,5 %). Frekvence různých typů somatických mutací je tedy odlišná od germinálních mutací.

Pacot et al. (2024a) zjistili, že pacienti s NF1D s genetickými mozaikami častěji vykazují mírnější fenotypy. Mozaicismus však komplikuje prenatální diagnózu, protože mutace nemusí být přítomna ve všech analyzovaných buňkách. K jeho detekci se často využívají mikrosatelitové markery. Nepředvídatelný klinický průběh u potomků může navíc velice komplikovat rozhodnutí potenciálních rodičů o přerušení těhotenství.

## 6.1 Korelace mezi typem mutace a fenotypem

V této podkapitole jsou blíže popsány studie zaměřené na hledání souvislosti mezi genotypem a fenotypem, spolu s grafy shrnujícími zjištěná data. Ačkoliv uvedené studie sledují vliv mutace na 12 různých fenotypových projevů, v bakalářské práci se zaměřuji pouze na tři vybrané fenotypy: kávové skvrny (CLS), neurofibromy (společně kutánní, plexiformní a MPNST) a kognitivní deficity (snížené IQ, porucha řeči, poruchy pozornosti, autismus).

CLS jsou příkladem nejčastějšího a nejdříve se vyskytujícího fenotypu. V kontrastu k CLS jsem vybrala neurofibromy, které jsou hlavní příčinou kratší průměrné délky života u pacientů s NF1D (Patil & Chamberlain, 2012). Kognitivní deficity významně zhoršují kvalitu života postižených osob i jejich rodin.



**Graf č. 2: Korelace mezi typem mutace a vybraným fenotypem NF1D ve studii Gjorgjievska et al. (2023)**

Pro srovnání s dalšími studiemi byl tento graf upraven a zaměřen na tři vybrané znaky – CLS, kognitivní poruchy a neurofibromy. Osa x shrnuje různé typy mutací, osa y udává pravděpodobnost výskytu fenotypu (a,b,c), má-li pacient daný typ mutace.

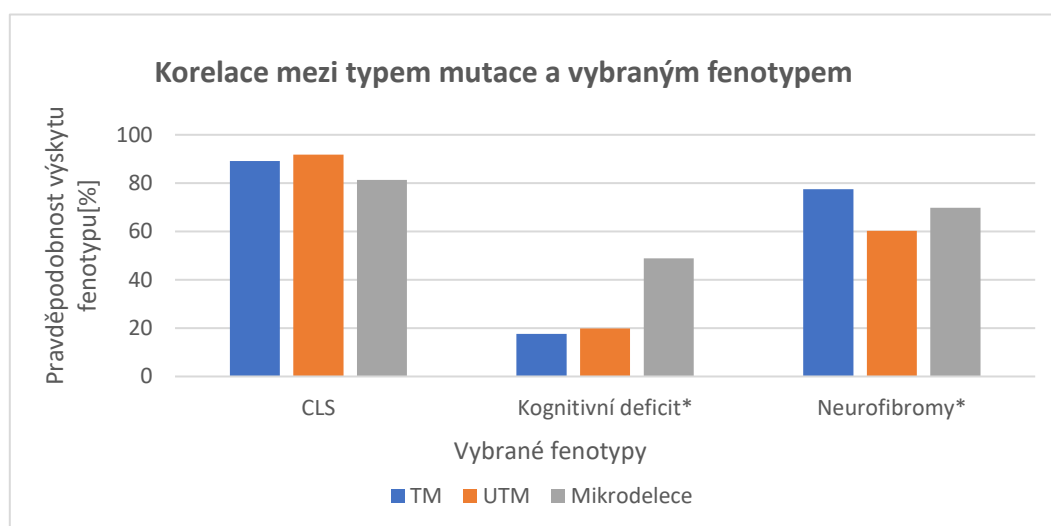
Kávové skvrny skutečně byly nejčastějším znakem u všech studií. U 95 % pacientů s NF1D se objevují již během prvního roku života (Gjorgjievska et al., 2023). Je-li věkový průměr pacientů vyšší, lze očekávat, že se CLS budou vyskytovat u každého z nich.

Gjorgjievska et al. (2023) zkoumali 27 makedonských pacientů s potvrzenou mutací v genu *NF1*. I přes malý soubor pacientů bylo odhaleno deset nových mutací v genu *NF1*. Studie navrhuje

zajímavou analýzu, vzhledem k velmi nízkému počtu pacientů však nejsou její závěry průkazné. **Graf č. 2** ukazuje, že zastoupení mutací podmiňujících 3 vybrané fenotypové projevy se liší. Mezi typy mutací způsobujících neurofibromy a kognitivní poruchy jsou výrazné rozdíly. Kognitivní poruchy byly kromě mikrodelece spojeny častěji se zkrácením proteinu v oblasti domény GRD (Gjorgjievska et al., 2023).

Ho et al. (2022) zkoumali 832 pacientů s NF1D z Hong Kongu, u 93,3 % našli patogenní nebo pravděpodobně patogenní varianty v genu *NF1*. Frekvence mutací *de novo* byla 66 %. Ho et al. mutace zjednodušeně dělí na mikrodelece a dva typy intragenových mutací: mutace vedoucí k předčasné terminaci translace proteinu (TM, truncating mutations) a mutace bez zkrácení proteinu, nejčastěji missense (UTM, untruncating mutations).

Údaje o nalezených korelacích genotypu a fenotypu shrnuli do tabulky, z níž byl pro tuto práci vytvořen **Graf č. 3** podobného formátu jako **Graf č. 2**, zahrnující opět tři vybrané fenotypy – CLS, kognitivní deficity a neurofibromy. **Graf č. 3** pracuje s celkovým počtem 776 mutací v poměru 587 TM, 146 UTM a 43 mikrodeleceí.



**Graf č. 3 - Korelace mezi typem mutace a vybraným fenotypem NF1D ve studii Ho et al. (2022)**

\* kognitivní deficit - opožděná řeč, porucha intelektu, ADD (porucha pozornosti), ADHD (porucha pozornosti s hyperaktivitou), \* neurofibromy – plexiformní a kutánní  
Na ose x jsou vybrané fenotypy a typy mutací, osa y vyjadřuje pravděpodobnost výskytu daného fenotypu v případě, že je u pacienta daný typ mutace přítomen.

Narozdíl od studie Gjorgjievska et al. (2023) byly příčinou neurofibromů častěji i mikrodelece. Pravděpodobnou příčinou rozdílu je malá velikost souboru pacientů u studie Gjorgjievska et al. (2023).

Ho et al (2022) zjistili statisticky významně nižší frekvenci neurofibromů u pacientů s UTM než u pacientů s TM.

Pro UTM v oblasti genu kódující doménu GRD byla zaznamenána vyšší incidence malého vzrůstu, makrocefalie, ASD a nižší výskyt kutánních neurofibromů ve srovnání s ostatními pacienty (Ho et al., 2022).

Napolitano et al. (2022) zkoumali 85 dospělých pacientů s NF1D - 20 příbuzných z devíti rodin a 65 pacientů se sporadickými mutacemi. Celkem popsali 69 mutací, 7 z nich bylo nových. Ke vzniku zkráceného neurofibrominu vedlo cca 42 % popsaných mutací, 36 % bylo missense mutací, 4 % mikrolecí. Celkem 17 mutací se nacházelo v doméně GRD. Napolitano et al. se shodují na vyšší prevalenci kognitivních deficitů u pacientů s posunovými mutacemi v *NFI*.

Scala et al. (2021) analyzovali soubor 365 pacientů s NF1D s různým etnickým původem. Z celkového počtu 351 mutací byly nejčastější nonsense (28,5 %) a missense (24,2 %) substituce, poté posunové mutace (21,9 %). Sestřihových bylo 14 %, mikrolecí 3,4 %.

CLS se vyskytly u 96,2 %. Neurofibromy se objevily u 57,3 % pacientů (kutánní 36,7 % a plexiformní 20,5 %). Neurologické poruchy, kam Scala et al. řadí bolesti hlavy, epilepsii, behaviorální abnormality (ADHD, ASD), závažné poruchy učení a vývojové či intelektuální opoždění, postihly celkem 20,6 % pacientů.

Negativní korelaci našli mezi missense mutacemi a plexiformními neurofibromy, nonsense substituční mutace riziko jejich výskytu naopak zvyšovaly (Scala et al., 2021).

V závěru kapitoly lze potvrdit skutečnost zmíněnou v jejím úvodu, tedy že ani přes několik desetiletí výzkumné činnosti nelze korelace mezi genotypem a fenotypem NF1D považovat za objasněné. Rozdíly v závěrech jednotlivých studií mohou vyplývat z různých metodických přístupů, velikosti souborů pacientů, jejich etnického původu či průměrného věku v souboru. Navíc může hrát roli i samotná heterogenita NF1D, vliv modifikujících genů i epigenetických faktorů. Všechny tyto vlivy přímo souvisejí s variabilní expresivitou, které je věnována následující kapitola.

## 7. Variabilní expresivita u neurofibromatózy typu I

Vysoká variabilita klinického obrazu je charakteristickým rysem NF1D, na němž se podílí široká škála faktorů, kterých s postupujícím výzkumem neustále přibývá. Problém variabilní expresivity se vyskytuje i u dalších onemocnění, jako je např. Marfanův syndrom. Jedná se o monogenně podmíněnou, autozomálně dominantní chorobu způsobenou mutacemi v genu *FBNI* kódujícím fibrilin-1, který je hlavní složkou mikrofibril. Výskyt proteinu takřka ve všech typech buněk v případě jeho defektu vede k různým fenotypovým projevům na úrovni celého těla. Mezi ně patří např. kosterní a kardiovaskulární defekty, postižení plic, očí, kůže a mozku (Grange et al., 2020).

Monogenní poruchy, jako je právě NF1D a Marfanův syndrom, jsou pro svou složitost vhodnými modely pro studium komplexních znaků (Pemov et al., 2014).

Odhalení podstaty klinické variability by mohlo pomoci navrhnout nové způsoby terapie. Významnou roli v potenciální léčbě by mohly mít především modifikující geny a signální dráhy závislé na neurofibrominu. Využití inhibitorů či stimulátorů signálních drah, které jsou u pacientů s NF1D zasaženy, je alternativou ke genové terapii.

Ačkoli již byla identifikována řada potenciálních terapeutických cílů, stále je třeba překonat mnoho překážek, než bude možné navrhnout ucelený přístup k léčbě. S ohledem na komplexnost genetických a molekulárních mechanismů, které ovlivňují klinický obraz NF1D, bude dosažení tohoto cíle vyžadovat další intenzivní výzkum (Wang et al., 2021).

## 7.1 Detekce fenotypové variability pomocí analýzy rodin

Heterogenita NF1D je dána faktory genetickými i negenetickými. Vliv negenetických faktorů je prozatím relativně málo objasněn. Sporný je např. vliv hormonů na vznik či růst kutánních neurofibromů (CNF). Navrhován byl vliv růstových hormonů. Paradoxně však byla u dětí s NF1D zaznamenána jak jejich nadměrná sekrece, tak nedostatek (Bizzarri & Bottaro, 2015). Role růstových hormonů při vzniku a růstu CNF tedy dosud není jasná. Kromě růstových hormonů bylo navrženo, že vývoj CNF ovlivňují také steroidní hormony. V různých vzorcích CNF byly pozorovány receptory pro estrogen a ještě častěji receptory pro progesteron (Geller et al., 2008). Dugoff a Sujansky (1996) zkoumali soubor 105 těhotných žen, 60 % z nich zaznamenalo zvýšení počtu CNF během těhotenství. Studie z následujících let však přinesly rozporuplné výsledky. Vliv hormonů tak prozatím zůstává neobjasněn (Jiang et al., 2023).

Variabilita projevů NF1D je ovlivněna věkem pacientů. Diagnóza je potvrzena u 97 % pacientů ve věku do 8 let, ve 20 letech již splňují diagnostická kritéria všichni (DeBella et al., 2000; Napolitano et al., 2022). V rodinných studiích lepší shodu vykazují postižení sourozenci než páry postižených rodičů a potomků (Szudek et al., 2002; Sabbagh et al., 2009).

Studie na několika zvířecích modelech prokázaly, že zranění jedinci jsou náchylnější k vývoji CNF i PNF. Za normálních okolností vede poranění nervů k proliferaci Schwannových buněk i fibroblastů, která však zvyšuje riziko LOH a hyperproliferace těchto buněk (Yang et al., 2006; Jiang et al., 2023).

Genetické faktory zahrnují typy mutací v genu *NF1* (viz *Kapitola 6*), ztrátu heterozygosity (viz *Kapitola 4.1*), modifikující geny a epigenetické faktory.

Modifikující geny zahrnují geny kódující proteiny, miRNA a lncRNA, které mohou ovlivnit fenotypové projevy NF1D (Kowalski et al., 2020). Easton et al. (1993) byli prvními, kdo u souboru mnoha rodin prokázali vliv modifikujících genů na počet kávových skvrn (CLS). Tím podnítli vznik mnoha studií, které se pokusily objasnit intrafamiliární variabilitu NF1D. Szudek et al. (2002) studovali vliv genetických faktorů u 904 pacientů ze 373 rodin s 2 či více členy s NF1D. Při sledování fenotypové variability u příbuzných různého stupně došli ke dvěma závěrům: Lischovy noduly a CLS se vyskytovaly v podobné míře zejména u příbuzných 1. stupně. Častější shodu mezi sourozenci než mezi rodiči a potomky pozorovali u neurofibromů, CLS a atypických pih. Závěry práce však nejsou v plné míře průkazné pro nedostatek rodin s více členy postiženými NF1D.

K přesnějším závěrům došli Sabbagh et al. (2009) zkoumající 750 pacientů z 275 francouzských rodin s dvěma či více členy s NF1D. Součástí bylo i 6 párů monozygotních (MZ) dvojčat. Sabbagh ve své studii zohlednil věk pacientů, navíc s vybranými fenotypy pracoval jako s kvantitativními znaky. U velkých CLS, pih v kožních záhybech, Lischových nodulů a obličejových malformací byla silnější korelace mezi sourozenci než mezi páry rodič-dítě. U malých CLS, podkožních neurofibromů, PNF a kognitivních deficitů byla korelace nejvyšší u MZ dvojčat, nižší, ale významná, mezi příbuznými 1. stupně a statisticky nevýznamná korelace mezi vzdálenějšími příbuznými. To poukazuje na silný vliv genetických faktorů.

Vliv typu mutace v genu *NF1* na celkovou fenotypovou variabilitu je překvapivě nízký – u CLS byl zaznamenán jejich malý vliv, u neurofibromů nebyl prokázán vůbec. Koeficient heritability se pohyboval v rozmezí 0,26 (CNF) až 0,62 (CLS malého rozsahu) (Sabbagh et al., 2009).

Ottenhoff et al. (2020) se zaměřili na variabilitu kognitivních deficitů 497 dětí s NF1D, včetně 12 párů MZ dvojčat a 17 sourozeneckých vztahů. Jedinci s mikrodelecemi zasahujícími i sousední geny měli nižší IQ než ti s intragenovými mutacemi - u nich je variabilita kognitivních schopností a korelace IQ mezi MZ dvojčaty s NF1D nebo mezi sourozenci s NF1D podobná jako v běžné populaci.

Variabilní expresivita NF1D se uplatňuje dokonce i u monozygotních dvojčat. Problémem je však jejich nedostatek mezi pacienty s NF1D. Fraga et al. (2005) zaznamenali v souboru 40 párů MZ dvojčat u cca třetiny rozdíly v metylaci DNA a modifikaci histonů. Tyto epigenetické markery byly rozloženy po celém jejich genomu a ovlivňovaly opakující se sekvence DNA a jednokopiové geny. Výraznější epigenetické rozdíly se vyskytovaly u MZ dvojčat, která byla starší, měla odlišný životní styl a trávila společně méně času.

Vliv metylace DNA pouze u genu *NF1* na přítomnost charakteristických fenotypových projevů NF1D byl analyzován v lymfocytech u 8 párů monozygotních dvojčat s odlišnými fenotypovými projevy (Harder et al., 2010).

Studie sledovala metylaci cytosinu v promotorové oblasti genu *NF1* i v 5'části transkriptu. Oblast -249 až +622 bp zahrnuje 72 CpG dinukleotidů a více než 250 dalších cytosinů mimo CpG dinukleotid. Dvojčata v rámci páru vykazovala významné rozdíly v metylaci, zejména v blízkosti promotoru, v 5' nepřekládané oblasti, exonu 1 a intronu 1. Autoři zjistili, že dvojče se závažnějšími projevy NF1D má vyšší podíl metylovaných cytosinů – u tří párů především v oblasti exonu 1, u jednoho páru v oblasti promotoru. Vyšší stupeň metylace byl zjištěn také u páru dvojčat s velmi časným výskytem neurofibromů.

V oblastech s nejčastějšími rozdíly mezi dvojčaty se nacházejí vazebná místa pro TATA-binding protein-like factor (vazba proteinu v promotoru zvyšuje transkripci *NF1*) a vazebná místa pro pozitivní transkripční faktor SP1 a represor AP2 v 5' nepřekládané oblasti genu (Zou et al., 2004; Harder et al., 2010).

Epigenetické modifikace byly popsány také v tumorsupresorovém genu *MSH2* kódujícím protein MSH2, který se podílí na mechanismu opravy nesprávně spárovaných nukleotidů. Titze et al. (2010) porovnávali metylaci šesti CpG ostrůvků v oblasti promotoru *MSH2* u 79 pacientů s NF1D a výsledky porovnávali s 79 zdravými jedinci. V obou skupinách nebyli žádní příbuzní. Methylace byla častější u pacientů s NF1D a zvýšená methylace korelovala s větší nádorovou zátěží.

## 7.2 Hledání modifikujících genů

D'Amico et al. (2021) zjišťovali, zda mutace v genech kódující proteiny s významem v dráze Ras/MAPK přispívají k variabilním fenotypovým znakům u pacientů s NF1D. U 4 jedinců ze 138 našli mutaci v genu *PTPN11*, kódujícím fosfatázu SHP2, která je pozitivním regulátorem signalizace Ras a podporuje tak nádorové bujení. Dvě nezávislé missense mutace, které zvyšovaly aktivitu SHP2 v *in vitro* testu, se vyskytovaly u dvou sourozenců a jednoho nepříbuzného jedince, u všech se závažným průběhem nemoci. Naopak, u čtvrtého pacienta s mírným průběhem NF1D, našli hypomorfní missense mutaci, která měla negativní efekt na aktivitu fosfatázy. Aktuálně se testují inhibitory SHP2, které blokují přenos signálu mezi RTK a signální dráhou Ras/MAPK, čímž ve výsledku tlumí proliferaci (Chou & Bivona, 2022).

Na základě databází GO (Gene Ontology) a HPO (Human Phenotype Ontology) a analýzou protein-proteinových interakcí mezi primárními interakčními partnery našli Kowalski et al. (2020) 10 genů modifikujících fenotyp pacientů s NF1D. Nejsilnějšími kandidáty byly na základě analýzy

obou databází geny *AKT*, *RAF1* a *PTEN*. Na základě Random Walk Analysis byly jako nejpravděpodobnější modifikující geny následně identifikovány *SDC2* a *VCP* (viz Kapitola 5.2.2). Těchto pět genů spolu s proteiny, které kódují, je popsáno v **Tabulce č. 6**.

Gen	Funkce kódovaného proteinu
<i>AKT1</i>	Serin threoninová kináza, role ve vývoji lidského nervového systému, inaktivace komponentů apoptózy
<i>PTEN</i>	Fosfatáza s tumorsupresorovou funkcí
<i>RAF1</i>	MAP3 kináza, role v buněčném cyklu, apoptóze a migraci buněk
<i>SDC2</i>	Syndekan 2, role v buněčné signalizaci, adhezi a organizaci cytoskeletu
<i>VCP</i>	Protein p97, role v degradaci proteinů, opravách DNA, regulaci buněčného cyklu atd.

**Tabulka č. 6 – Významné modifikující geny a funkce jimi kódovaných proteinů, údaje převzaty z (Kowalski et al., 2020)**

Celogenomová asociační studie (GWAS), jejímiž autory jsou Pacot et al. (2024b), zahrnuje více než 1300 pacientů s NF1D. K propojení signifikantních jednonukleotidových polymorfismů (SNP) s kandidátními geny byla využita nejen pozice SNP, ale i vliv topologicky asociovaných domén (TAD), změny genové exprese a modifikace chromatinu. Nalezli 168 kandidátních genů, které měly vliv na různé typy nádorů podmíněných mutací v genu *NF1*. Signifikantní SNP nalezené pro plexiformní, kutánní a subkutánní neurofibromy se lišily, lze tedy předpokládat, že se na jejich vzniku podílejí odlišné modifikující geny.

Funkční analýza potvrdila dva kandidátní geny, *SPRED2* a *GAS1*. Jejich inaktivace ovlivňuje růst Schwannových buněk. Protein *GAS1* blokuje přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu v normálních i nádorových buňkách, má tedy tumorsupresorový efekt. *SPRED2* je součástí rodiny proteinů negativně regulujících aktivaci dráhy Ras/MAPK vyvolanou růstovými faktory (Pacot et al., 2024b).

Sung et al. (2020) provedli GWAS za účelem nalezení kandidátních genů ovlivňujících počet CLS. Statisticky průkazný výsledek našli v oblasti genu *RPS6KA2* a *ADCY2*. Gen *RPS6KA2* kóduje jednu ze serin-threoninových kináz, které jsou fosforylovány a aktivovány kinázami signální dráhy Ras/MAPK. Gen *ADCY2* kóduje jeden z enzymů katalyzujících tvorbu cAMP z ATP.

Spolehlivějším přístupem při hledání kandidátních genů je geny analyzovat v rámci TAD, ne vždy je totiž gen ležící v blízkosti SNP tím kandidátním. Ideální je hledat gen v oblasti TAD, kde leží i pozitivní SNP (Way et al., 2017).

Studie o kandidátních genech přicházejí s velkým počtem potenciálních výsledků, které však z důvodu genetické heterogenity NF1D nejsou zcela průkazné. Detekce kandidátních genů je navíc

velmi citlivá na složení souboru pacientů, jejich průměrný věk, pohlaví či přesné určení fenotypu (Sung et al., 2020).

U kandidátních genů nalezených metodou GWAS je třeba ověřit jejich vliv na fenotyp. K tomu lze využít zvířecí modely s NF1D. Mezi nimi se nejvhodnějším zdá být zmíněné miniprase, u něhož lze pozorovat znaky charakteristické pro NF1D odpovídající lidským pacientům, jmenovitě CLS, neurofibromy, optické gliomy a s nižší frekvencí i Lischovy noduly a kognitivní deficity (Isakson et al., 2018). Naopak myší modely pro studium NF1D často selhávají kvůli genetickým rozdílům mezi nimi a lidmi. U mnoha mutací byly pozorovány odlišné či opačné fenotypy než u lidí (Li et al., 2016).

Význam v hledání vhodné léčby má také studium funkce a interakcí neurofibrominu v různých typech lidských tkání. Carrió et al. (2019) uvádí, že značný potenciál v něm mají Schwannovy buňky odvozené metodou iPSC z plexiformních nádorů pacientů s NF1D, které mají absenci obou alel genu *NF1*.

S NF1D jsou spojeny zmíněné kognitivní deficity, jejichž molekulární podstata dosud není zcela objasněna. Jedním z přístupů, který může přispět k identifikaci neuronálních drah podílejících se na těchto projevech, je genetický screening zaměřený na esenciální geny CNS. Wertz et al. (2020) navrhli metodu pro genetický screening *in vivo* v CNS myší, jejímž účelem je odhalit neuronální esenciální geny, které jsou spojeny s neurodegenerativními poruchami. Pomocí shRNA a metody CRISPR-Cas 9 identifikovali geny nezbytné pro přežití zralých neuronů. Výsledky ukazují, že neurony jsou zvláště citlivé na narušení procesů jako je proteostáza, zpracování mRNA, mitochondriální děje nebo autofagie. Autoři touto metodou zkoumali mimo WT myší i modely Huntingtonovy choroby, u nichž byla snížena transkripce neuronálních esenciálních genů. Objevili také nové modifikující geny spojené např. s metylací chromatinu nebo dopaminovou signalizací, čímž otevřeli nové terapeutické směry.

## 8. Závěr

Neurofibromatóza typu I představuje komplexní genetické onemocnění s vysokou variabilitou klinického obrazu. Přestože genetická podstata onemocnění je již poměrně dobře popsána, faktory podílející se na variabilitě fenotypových projevů zůstávají stále předmětem intenzivního výzkumu.

U pacientů s neurofibromatózou typu I bylo popsáno 4325 germinálních mutací, většina z nich vede ke zkrácení proteinu a snížení jeho stability. Vzácností nejsou ani mikrodelece zahrnující oblast 1,2–1,4 Mbp 17. chromozomu. Z analýz zaměřených na hledání korelace mezi genotypem a fenotypem vyplývá, že typ mutace v genu *NFI* není hlavním faktorem určujícím míru poškození. Zásadní vliv mají modifikující geny, jejichž produkty ovlivňují specifické fenotypové změny v různých tkáních. Z GWAS analýz vyplývá, že za dílčí fenotypové změny jsou zodpovědné různé modifikující geny.

Jednou z limitací GWAS analýz je, že jsou primárně zaměřeny na alely, které se v populaci vyskytují s vyšší frekvencí. Nemusí tak detekovat minoritní alely v esenciálních genech, které mají nízkou frekvenci.

V posledních letech vedl pokrok v molekulární biologii a genetice k významným objevům, které prohloubily porozumění této chorobě. Odhalení struktury neurofibrominu umožnilo lépe pochopit dopad substitučních mutací na stabilitu a funkčnost dimeru a poskytlo tak cenné informace pro vývoj cílených terapeutických strategií. Významný přínos v této oblasti mají také moderní experimentální modely včetně studií na lidských neurálních buňkách odvozených metodou iPSC.

Ani tato metoda však ke studiu mnoha aspektů nemoci nemusí být použitelná. Příkladem mohou být rozličná onemocnění mozku, za něž odpovídají esenciální geny, které mají expresi omezenou na specifické mozkové tkáně a často jsou exprimovány již během prenatálního vývoje. Pro jejich studium jsou nezbytné *in vivo* modely, běžně používané buněčné linie odhalují jen soubor tkáňově nespecifických esenciálních genů.

Navzdory veškerým pokrokům tedy nelze variabilní expresivitu NF1D považovat za objasněnou. Podpora jejího výzkumu je klíčová nejen pro zkvalitnění diagnostiky a predikce průběhu onemocnění, ale i pro nalezení nových terapeutických přístupů.

## 9. Seznam použité literatury

### \* Přehledové články

- Anastasaki, C., & Gutmann, D. H. (2014). Neuronal NF1/RAS regulation of cyclic AMP requires atypical PKC activation. *Human Molecular Genetics*, 23(25), 6712–6721. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu389>
- Anastasaki, C., Le, L. Q., Kesterson, R. A., & Gutmann, D. H. (2017). Updated nomenclature for human and mouse neurofibromatosis type 1 genes. *Neurology. Genetics*, 3(4), e169. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000169>
- Assunto, A., Ferrara, U., De Luca, A., Pivonello, C., Lombardo, L., Piscitelli, A., Tortora, C., Pinna, V., Daniele, P., Pivonello, R., Russo, M. G., Limongelli, G., Colao, A., Tartaglia, M., Strisciuglio, P., & Melis, D. (2019). Isoform-specific NF1 mRNA levels correlate with disease severity in Neurofibromatosis type 1. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 261. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1223-1>
- \* Báez-Flores, J., Rodríguez-Martín, M., & Lacal, J. (2023). The therapeutic potential of neurofibromin signaling pathways and binding partners. *Communications Biology*, 6(1), 436. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04815-0>
- Bai, R.-Y., Esposito, D., Tam, A. J., McCormick, F., Riggins, G. J., Wade Clapp, D., & Staedtke, V. (2019). Feasibility of using NF1-GRD and AAV for gene replacement therapy in NF1-associated tumors. *Gene Therapy*, 26(6), 277–286. <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0080-9>
- Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M., & Collins, F. (1990). The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell*, 63(4), 851–859. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90151-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90151-4)
- Ballester, R., Michaeli, T., Ferguson, K., Xu, H. P., McCormick, F., & Wigler, M. (1989). Genetic analysis of mammalian GAP expressed in yeast. *Cell*, 59(4), 681–686. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90014-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90014-7)
- Barron, V. A., & Lou, H. (2012). Alternative splicing of the neurofibromatosis type I pre-mRNA. *Bioscience Reports*, 32(2), 131–138. <https://doi.org/10.1042/BSR20110060>
- \* Bergoug, M., Doudeau, M., Godin, F., Mosrin, C., Vallée, B., & Bénédetti, H. (2020). Neurofibromin Structure, Functions and Regulation. *Cells*, 9(11), 2365. <https://doi.org/10.3390/cells9112365>
- Bergoug, M., Mosrin, C., Serrano, A., Godin, F., Doudeau, M., Dundović, I., Goffinont, S., Normand, T., Suskiewicz, M. J., Vallée, B., & Bénédetti, H. (2024). An Atypical Mechanism of SUMOylation of Neurofibromin SecPH Domain Provides New Insights into SUMOylation Site Selection. *Journal of Molecular Biology*, 436(22), 168768. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2024.168768>
- Bizzarri, C., & Bottaro, G. (2015). Endocrine Implications of Neurofibromatosis 1 in Childhood. *Hormone Research in Paediatrics*, 83(4), 232–241. <https://doi.org/10.1159/000369802>
- Boyanapalli, M., Lahoud, O. B., Messiaen, L., Kim, B., Anderle de Saylor, M. S., Duckett, S. J., Somara, S., & Mikol, D. D. (2006). Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(4), 1200–1208. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.129>
- \* Brosseau, J.-P., Liao, C.-P., & Le, L. Q. (2020). Translating current basic research into future therapies for neurofibromatosis type 1. *British Journal of Cancer*, 123(2), 178–186. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0903-x>
- Brosseau, J.-P., Liao, C.-P., Wang, Y., Ramani, V., Vandergriff, T., Lee, M., Patel, A., Ariizumi, K., & Le, L. Q. (2018). NF1 heterozygosity fosters de novo tumorigenesis but impairs malignant transformation. *Nature Communications*, 9(1), 5014. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07452-y>
- Brown, J. A., Diggs-Andrews, K. A., Gianino, S. M., & Gutmann, D. H. (2012). Neurofibromatosis-1 heterozygosity impairs CNS neuronal morphology in a cAMP/PKA/ROCK-dependent manner. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 49(1), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.08.008>
- Cao, P., Feng, F., Dong, G., Yu, C., Feng, S., Song, E., Shi, G., Liang, Y., & Liang, G. (2015). Estrogen receptor  $\alpha$  enhances the transcriptional activity of ETS-1 and promotes the proliferation, migration and invasion of neuroblastoma cell in a ligand dependent manner. *BMC Cancer*, 15, 491. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1495-3>
- Carrió, M., Mazuelas, H., Richaud-Patin, Y., Gel, B., Terribas, E., Rosas, I., Jimenez-Delgado, S., Biayna, J., Vendredy, L., Blanco, I., Castellanos, E., Lázaro, C., Raya, Á., & Serra, E. (2019). Reprogramming Captures the Genetic and Tumorigenic Properties of Neurofibromatosis Type 1 Plexiform Neurofibromas. *Stem Cell Reports*, 12(2), 411–426. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.001>
- Chou, Y.-T., & Bivona, T. G. (2022). Inhibition of SHP2 as an approach to block RAS-driven cancers. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 153, pp. 205–236). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.07.002>

- Cichowski, K., Santiago, S., Jardim, M., Johnson, B. W., & Jacks, T. (2003). Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. *Genes & Development*, *17*(4), 449–454. <https://doi.org/10.1101/gad.1054703>
- Collins, F. S., O'Connell, P., Ponder, B. A., & Seizinger, B. R. (1989). Progress towards identifying the neurofibromatosis (NF1) gene. *Trends in Genetics: TIG*, *5*(7), 217–221. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90085-1](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90085-1)
- Costa, R. M., Yang, T., Huynh, D. P., Pulst, S. M., Viskochil, D. H., Silva, A. J., & Brannan, C. I. (2001). Learning deficits, but normal development and tumor predisposition, in mice lacking exon 23a of Nf1. *Nature Genetics*, *27*(4), 399–405. <https://doi.org/10.1038/86898>
- D'Amico, A., Rosano, C., Pannone, L., Pinna, V., Assunto, A., Motta, M., Ugga, L., Daniele, P., Mandile, R., Mariniello, L., Siano, M. A., Santoro, C., Piluso, G., Martinelli, S., Strisciuglio, P., De Luca, A., Tartaglia, M., & Melis, D. (2021). Clinical variability of neurofibromatosis 1: A modifying role of cooccurring *PTPN11* variants and atypical brain MRI findings. *Clinical Genetics*, *100*(5), 563–572. <https://doi.org/10.1111/cge.14040>
- Danglot, G., Regnler, V., Fauvet, D., Vassal, G., Kujas, M., & Bernheim, A. (1995). Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene. *Human Molecular Genetics*, *4*(5), 915–920. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.5.915>
- Dasgupta, B., Dugan, L. L., & Gutmann, D. H. (2003). The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(26), 8949–8954. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-26-08949.2003>
- Daston, M. M., Scrabble, H., Nordlund, M., Sturbaum, A. K., Nissen, L. M., & Ratner, N. (1992). The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. *Neuron*, *8*(3), 415–428. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90270-n](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90270-n)
- De Luca, A., Bottillo, I., Dasdia, M. C., Morella, A., Lanari, V., Bernardini, L., Divona, L., Giustini, S., Sinibaldi, L., Novelli, A., Torrente, I., Schirinzi, A., & Dallapiccola, B. (2007). Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Journal of Medical Genetics*, *44*(12), 800–808. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.053785>
- De Raedt, T., Beert, E., Pasmant, E., Luscan, A., Brems, H., Ortonne, N., Helin, K., Hornick, J. L., Mautner, V., Kehrer-Sawatzki, H., Clapp, W., Bradner, J., Vidaud, M., Upadhyaya, M., Legius, E., & Cichowski, K. (2014). PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. *Nature*, *514*(7521), 247–251. <https://doi.org/10.1038/nature13561>
- De Schepper, S., Maertens, O., Callens, T., Naeyaert, J.-M., Lambert, J., & Messiaen, L. (2008). Somatic mutation analysis in NF1 café au lait spots reveals two NF1 hits in the melanocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, *128*(4), 1050–1053. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701095>
- DeBella, K., Szudek, J., & Friedman, J. M. (2000). Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics*, *105*(3 Pt 1), 608–614. <https://doi.org/10.1542/peds.105.3.608>
- Deraredj Nadim, W., Chaumont-Dubel, S., Madouri, F., Cobret, L., De Tauzia, M.-L., Zajdel, P., Bénédicti, H., Marin, P., & Morisset-Lopez, S. (2016). Physical interaction between neurofibromin and serotonin 5-HT6 receptor promotes receptor constitutive activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(43), 12310–12315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600914113>
- Dischinger, P. S., Tovar, E. A., Essenburg, C. J., Madaj, Z. B., Gardner, E. E., Callaghan, M. E., Turner, A. N., Challa, A. K., Kempston, T., Eagleson, B., Kesterson, R. A., Bronson, R. T., Bowman, M. J., Graveel, C. R., & Steensma, M. R. (2018). NF1 deficiency correlates with estrogen receptor signaling and diminished survival in breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, *4*, 29. <https://doi.org/10.1038/s41523-018-0080-8>
- Dugoff, L., & Sujansky, E. (1996). Neurofibromatosis type 1 and pregnancy. *American Journal of Medical Genetics*, *66*(1), 7–10. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19961202\)66:1<7::AID-AJMG2>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19961202)66:1<7::AID-AJMG2>3.0.CO;2-R)
- Dzieran, J., Rodriguez Garcia, A., Westermark, U. K., Henley, A. B., Eyre Sánchez, E., Träger, C., Johansson, H. J., Lehtiö, J., & Arsenian-Henriksson, M. (2018). MYCN-amplified neuroblastoma maintains an aggressive and undifferentiated phenotype by deregulation of estrogen and NGF signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(6), E1229–E1238. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710901115>
- Easton, D. F., Ponder, M. A., Huson, S. M., & Ponder, B. A. (1993). An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): Evidence for modifying genes. *American Journal of Human Genetics*, *53*(2), 305–313.
- \* Evans, D. G. R. (2009). Neurofibromatosis type 2 (NF2): A clinical and molecular review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *4*, 16. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-16>
- Feng, L., Yunoue, S., Tokuo, H., Ozawa, T., Zhang, D., Patrakitkomjorn, S., Ichimura, T., Saya, H., & Araki, N. (2004). PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. *FEBS Letters*, *557*(1–3), 275–282. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01507-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01507-2)

- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benítez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y.-Z., ... Esteller, M. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(30), 10604–10609. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500398102>
- García-Linares, C., Fernández-Rodríguez, J., Terribas, E., Mercadé, J., Pros, E., Benito, L., Benavente, Y., Capellà, G., Ravella, A., Blanco, I., Kehrer-Sawatzki, H., Lázaro, C., & Serra, E. (2011). Dissecting loss of heterozygosity (LOH) in neurofibromatosis type 1-associated neurofibromas: Importance of copy neutral LOH. *Human Mutation*, *32*(1), 78–90. <https://doi.org/10.1002/humu.21387>
- Garzon, J. P., Patete, A., Aschbacher-Smith, L., Qu'd, D., Kelly-Mancuso, G., Raski, C. R., Weisman, A. G., Hankins, M., Sawin, M., Kim, K., Drackley, A., Zeid, J., Weaver, K. N., Hopkin, R. J., Saal, H. M., Charrow, J., Schorry, E., Listernick, R., Simpson, B. N., & Prada, C. E. (2024). Expanding the phenotype of neurofibromatosis type 1 microdeletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, *196*(4), e32095. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.32095>
- Geller, M., Mezitis, S. G. E., Nunes, F. P., Ribeiro, M. G., Araújo, A. P. D. Q. C., Bronstein, M. D., Siqueira-Batista, R., Gomes, A. P., Oliveira, L., & Cunha, K. S. G. (2008). Progesterone and Estrogen Receptors in Neurofibromas of Patients with NF1. *Clinical Medicine. Pathology*, *1*, CPath.S1002. <https://doi.org/10.4137/CPath.S1002>
- \* Giraud, J.-S., Bièche, I., Pasmant, É., & Tlemsani, C. (2023). NF1 alterations in cancers: Therapeutic implications in precision medicine. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *32*(10), 941–957. <https://doi.org/10.1080/13543784.2023.2263836>
- Gjorgjievska, M., Bozhinovski, G., Sukarova-Angelovska, E., Kocova, M., Kanzoska, L. M., & Plaseska-Karanfilska, D. (2023). Mutational Spectrum and Genotype-phenotype Correlations in Neurofibromatosis Type 1 Patients from North Macedonia: Identification of Ten Novel NF1 Pathogenic Variants. *Balkan Medical Journal*, *40*(4), 252–261. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2023.2022-12-28>
- Gouzi, J. Y., Moresis, A., Walker, J. A., Apostolopoulou, A. A., Palmer, R. H., Bernards, A., & Skoulakis, E. M. C. (2011). The receptor tyrosine kinase Alk controls neurofibromin functions in Drosophila growth and learning. *PLoS Genetics*, *7*(9), e1002281. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002281>
- Grange, T., Aubart, M., Langeois, M., Benarroch, L., Arnaud, P., Milleron, O., Eliahou, L., Gross, M.-S., Hanna, N., Boileau, C., Gouya, L., & Jondeau, G. (2020). Quantifying the Genetic Basis of Marfan Syndrome Clinical Variability. *Genes*, *11*(5), 574. <https://doi.org/10.3390/genes11050574>
- Gross, A. M., Wolters, P. L., Dombi, E., Baldwin, A., Whitcomb, P., Fisher, M. J., Weiss, B., Kim, A., Bornhorst, M., Shah, A. C., Martin, S., Roderick, M. C., Pichard, D. C., Carbonell, A., Paul, S. M., Therrien, J., Kapustina, O., Heisey, K., Clapp, D. W., ... Widemann, B. C. (2020). Selumetinib in Children with Inoperable Plexiform Neurofibromas. *New England Journal of Medicine*, *382*(15), 1430–1442. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1912735>
- \* Gutmann, D. H., Cole, J. L., & Collins, F. S. (1994). Modulation of neurofibromatosis type 1 gene expression during in vitro myoblast differentiation. *Journal of Neuroscience Research*, *37*(3), 398–405. <https://doi.org/10.1002/jnr.490370312>
- Han, S. H., Kang, E. J., Yang, M., Kim, S., Lee, S. G., & Lee, E. H. (2024). Mutation spectrum of NF1 gene in Korean unrelated patients with neurofibromatosis 1: Six novel pathogenic variants. *Journal of Genetic Medicine*, *21*(1), 22–30. <https://doi.org/10.5734/JGM.2024.21.1.22>
- Hannan, F., Ho, I., Tong, J. J., Zhu, Y., Nurnberg, P., & Zhong, Y. (2006). Effect of neurofibromatosis type I mutations on a novel pathway for adenyl cyclase activation requiring neurofibromin and Ras. *Human Molecular Genetics*, *15*(7), 1087–1098. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl023>
- Harder, A., Titze, S., Herbst, L., Harder, T., Guse, K., Tinschert, S., Kaufmann, D., Rosenbaum, T., Mautner, V. F., Windt, E., Wahlländer-Danek, U., Wimmer, K., Mundlos, S., & Peters, H. (2010). Monozygotic twins with neurofibromatosis type 1 (NF1) display differences in methylation of NF1 gene promoter elements, 5' untranslated region, exon and intron 1. *Twin Research and Human Genetics: The Official Journal of the International Society for Twin Studies*, *13*(6), 582–594. <https://doi.org/10.1375/twin.13.6.582>
- Ho, S. K. I., Luk, H., Ng, S. Y. L., Yu, K. P., Cheng, S. S. W., Ng, P. P., Mok, M. T., Hau, E. W. L., & Lo, I. F. M. (2022). Old and new perspectives on Neurofibromatosis type 1: Clinical and molecular characterization of 832 patients from a single centre over 16 years. *European Journal of Medical Genetics*, *65*(4), 104474. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2022.104474>
- \* Hu, H.-T., Shih, P.-Y., Shih, Y.-T., & Hsueh, Y.-P. (2016). The Involvement of Neuron-Specific Factors in Dendritic Spinogenesis: Molecular Regulation and Association with Neurological Disorders. *Neural Plasticity*, *2016*, 5136286. <https://doi.org/10.1155/2016/5136286>
- Isakson, S. H., Rizzardi, A. E., Coutts, A. W., Carlson, D. F., Kirstein, M. N., Fisher, J., Vitte, J., Williams, K. B., Pluhar, G. E., Dahiya, S., Widemann, B. C., Dombi, E., Rizvi, T., Ratner, N., Messiaen, L., Stemmer-Rachamimov, A.

- O., Fahrenkrug, S. C., Gutmann, D. H., Giovannini, M., ... Watson, A. L. (2018). Genetically engineered minipigs model the major clinical features of human neurofibromatosis type 1. *Communications Biology*, 1(1), 158. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0163-y>
- Jacks, T., Shih, T. S., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Bernards, A., & Weinberg, R. A. (1994). Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in *Nf1*. *Nature Genetics*, 7(3), 353–361. <https://doi.org/10.1038/ng0794-353>
- \* Jiang, C., McKay, R. M., Lee, S. Y., Romo, C. G., Blakeley, J. O., Haniffa, M., Serra, E., Steensma, M. R., Largaespada, D., & Le, L. Q. (2023). Cutaneous Neurofibroma Heterogeneity: Factors that Influence Tumor Burden in Neurofibromatosis Type 1. *The Journal of Investigative Dermatology*, 143(8), 1369–1377. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.12.027>
- Johannessen, C. M., Reczek, E. E., James, M. F., Brems, H., Legius, E., & Cichowski, K. (2005). The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8573–8578. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503224102>
- Kaczorowski, J. A., Smith, T. F., Shrewsbury, A. M., Thomas, L. R., Knopik, V. S., & Acosta, M. T. (2020). Neurofibromatosis Type 1 Implicates Ras Pathways in the Genetic Architecture of Neurodevelopmental Disorders. *Behavior Genetics*, 50(4), 191–202. <https://doi.org/10.1007/s10519-020-09991-x>
- \* Kalimuthu, S. N., & Chetty, R. (2016). Gene of the month: SMARCB1. *Journal of Clinical Pathology*, 69(6), 484–489. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2016-203650>
- Kaufmann, D., Müller, R., Kenner, O., Leistner, W., Hein, C., Vogel, W., & Bartelt, B. (2002). The N-terminal splice product NF1-10a-2 of the NF1 gene codes for a transmembrane segment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), 496–503. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00501-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00501-6)
- \* Kehrer-Sawatzki, H., & Cooper, D. N. (2021). Classification of NF1 microdeletions and its importance for establishing genotype/phenotype correlations in patients with NF1 microdeletions. *Human Genetics*, 140(12), 1635–1649. <https://doi.org/10.1007/s00439-021-02363-3>
- Kluwe, L., Friedrich, R., & Mautner, V.-F. (1999). Loss of NF1 allele in schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 24(3), 283–285. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199903\)24:3<283::AID-GCC15>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199903)24:3<283::AID-GCC15>3.0.CO;2-K)
- Koczkowska, M., Callens, T., Chen, Y., Gomes, A., Hicks, A. D., Sharp, A., Johns, E., Uhas, K. A., Armstrong, L., Bosanko, K. A., Babovic-Vuksanovic, D., Baker, L., Basel, D. G., Bengala, M., Bennett, J. T., Chambers, C., Clarkson, L. K., Clementi, M., Cortés, F. M., ... Messiaen, L. M. (2020). Clinical spectrum of individuals with pathogenic *NF1* missense variants affecting p.Met1149, p.Arg1276, and p.Lys1423: Genotype–phenotype study in neurofibromatosis type 1. *Human Mutation*, 41(1), 299–315. <https://doi.org/10.1002/humu.23929>
- Koivunen, J., Ylä-Outinen, H., Korkiamäki, T., Karvonen, S.-L., Pöyhönen, M., Laato, M., Karvonen, J., Peltonen, S., & Peltonen, J. (2000). New Function for NF1 Tumor Suppressor. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(3), 473–479. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00882.x>
- Koliou, X., Fedonidis, C., Kalpachidou, T., & Mangoura, D. (2016). Nuclear import mechanism of neurofibromin for localization on the spindle and function in chromosome congression. *Journal of Neurochemistry*, 136(1), 78–91. <https://doi.org/10.1111/jnc.13401>
- Li, C., Cheng, Y., Gutmann, D. A., & Mangoura, D. (2001). Differential localization of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene product, neurofibromin, with the F-actin or microtubule cytoskeleton during differentiation of telencephalic neurons. *Developmental Brain Research*, 130(2), 231–248. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(01\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(01)00190-0)
- Li, K., Turner, A. N., Chen, M., Brosius, S. N., Schoeb, T. R., Messiaen, L. M., Bedwell, D. M., Zinn, K. R., Anastasaki, C., Gutmann, D. H., Korf, B. R., & Kesterson, R. A. (2016). Mice with missense and nonsense *NF1* mutations display divergent phenotypes compared to NF1 patients. *Disease Models & Mechanisms*, dmm.025783. <https://doi.org/10.1242/dmm.025783>
- Lu, H., Liu, P., & Pang, Q. (2021). MiR-27a-3p/miR-27b-3p Promotes Neurofibromatosis Type 1 via Targeting of NF1. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71(11), 2353–2363. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01779-2>
- Lupton, C. J., Bayly-Jones, C., D’Andrea, L., Huang, C., Schittenhelm, R. B., Venugopal, H., Whisstock, J. C., Halls, M. L., & Ellisdon, A. M. (2021). The cryo-EM structure of the human neurofibromin dimer reveals the molecular basis for neurofibromatosis type 1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 28(12), 982–988. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00687-2>
- Mangoura, D., Sun, Y., Li, C., Singh, D., Gutmann, D. H., Flores, A., Ahmed, M., & Vallianatos, G. (2006). Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells. *Oncogene*, 25(5), 735–745. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209113>
- McGillicuddy, L. T., Fromm, J. A., Hollstein, P. E., Kubek, S., Beroukhi, R., De Raedt, T., Johnson, B. W., Williams, S. M. G., Nghiemphu, P., Liao, L. M., Cloughesy, T. F., Mischel, P. S., Parret, A., Seiler, J., Moldenhauer, G., Scheffzek, K., Stemmer-Rachamimov, A. O., Sawyers, C. L., Brennan, C., ... Cichowski, K. (2009).

- Proteasomal and genetic inactivation of the NF1 tumor suppressor in gliomagenesis. *Cancer Cell*, 16(1), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.05.009>
- \* Mo, J., Moye, S. L., McKay, R. M., & Le, L. Q. (2022). Neurofibromin and suppression of tumorigenesis: Beyond the GAP. *Oncogene*, 41(9), 1235–1251. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02156-y>
- Moss, C., & Green, S. H. (1994). What is segmental neurofibromatosis? *The British Journal of Dermatology*, 130(1), 106–110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1994.tb06893.x>
- Napolitano, F., Dell’Aquila, M., Terracciano, C., Franzese, G., Gentile, M. T., Piluso, G., Santoro, C., Colavito, D., Patanè, A., De Blasiis, P., Sampaolo, S., Paladino, S., & Melone, M. A. B. (2022). Genotype-Phenotype Correlations in Neurofibromatosis Type 1: Identification of Novel and Recurrent NF1 Gene Variants and Correlations with Neurocognitive Phenotype. *Genes*, 13(7), 1130. <https://doi.org/10.3390/genes13071130>
- Naschberger, A., Baradaran, R., Rupp, B., & Carroni, M. (2021). The structure of neurofibromin isoform 2 reveals different functional states. *Nature*, 599(7884), 315–319. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04024-x>
- Ottenhoff, M. J., Rietman, A. B., Mous, S. E., Plasschaert, E., Gawehns, D., Brems, H., Oostenbrink, R., ENCORE-NF1 Team, van Minkelen, R., Nellist, M., Schorry, E., Legius, E., Moll, H. A., & Elgersma, Y. (2020). Examination of the genetic factors underlying the cognitive variability associated with neurofibromatosis type 1. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 22(5), 889–897. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0752-2>
- Ozawa, T., Araki, N., Yunoue, S., Tokuo, H., Feng, L., Patrakitkomjorn, S., Hara, T., Ichikawa, Y., Matsumoto, K., Fujii, K., & Saya, H. (2005). The neurofibromatosis type 1 gene product neurofibromin enhances cell motility by regulating actin filament dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-cofilin pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39524–39533. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503707200>
- Pacot, L., Vidaud, D., Ye, M., Chansavang, A., Coustier, A., Maillard, T., Barbance, C., Laurendeau, I., Hébrard, B., Lunati-Rozie, A., Funalot, B., Wolkenstein, P., Vidaud, M., Goldenberg, A., Morice-Picard, F., Hadjadj, D., Parfait, B., & Pasmant, E. (2024a). Prenatal diagnosis for neurofibromatosis type 1 and the pitfalls of germline mosaics. *Npj Genomic Medicine*, 9(1), 41. <https://doi.org/10.1038/s41525-024-00425-9>
- Pacot, L., Sabbagh, A., Sohier, P., Hadjadj, D., Ye, M., Boland-Auge, A., Bacq-Daian, D., Laurendeau, I., Briand-Suleau, A., Deleuze, J.-F., Margueron, R., Vidaud, M., Ferkal, S., Parfait, B., Vidaud, D., NF-France Network, Pasmant, E., & Wolkenstein, P. (2024b). Identification of potential common genetic modifiers of neurofibromas: A genome-wide association study in 1333 patients with neurofibromatosis type 1. *The British Journal of Dermatology*, 190(2), 226–243. <https://doi.org/10.1093/bjd/ljad390>
- Park, V. M., Kenwright, K. A., Sturtevant, D. B., & Pivnick, E. K. (1998). Alternative splicing of exons 29 and 30 in the neurofibromatosis type 1 gene. *Human Genetics*, 103(4), 382–385. <https://doi.org/10.1007/s004390050837>
- Pasini, D., Malatesta, M., Jung, H. R., Walfridsson, J., Willer, A., Olsson, L., Skotte, J., Wutz, A., Porse, B., Jensen, O. N., & Helin, K. (2010). Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes. *Nucleic Acids Research*, 38(15), 4958–4969. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq244>
- Patil, S., & Chamberlain, R. S. (2012). Neoplasms associated with germline and somatic NF1 gene mutations. *The Oncologist*, 17(1), 101–116. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0181>
- Pemov, A., Heejeong Sung<sup>2</sup>, Paula L. Hyland<sup>3</sup>, Jennifer L. Sloan<sup>4</sup>, Sarah L. Ruppert<sup>4</sup>, Andrea M. Baldwin<sup>5</sup>, Joseph F. Boland<sup>6</sup>, Sara E. Bass<sup>6</sup>, Hyo Jung Lee<sup>6</sup>, Kristine M. Jones<sup>6</sup>, Xijun Zhang<sup>6</sup>, NISC Comparative Sequencing Program<sup>7</sup>, James C. Mullikin<sup>7</sup>, Brigitte C. Widemann<sup>5</sup>, Alexander F. Wilson<sup>2</sup>, Douglas R. Stewart<sup>1</sup>, & \*. (2014). *Genetic Modifiers of Neurofibromatosis Type 1-Associated Cafe’-au-Lait Macule Count Identified Using Multi-platform Analysis*.
- Peta, C., Tsirimonaki, E., Samouil, D., Georgiadou, K., & Mangoura, D. (2020). Nuclear Isoforms of Neurofibromin Are Required for Proper Spindle Organization and Chromosome Segregation. *Cells*, 9(11), 2348. <https://doi.org/10.3390/cells9112348>
- \* Philpott, C., Tovell, H., Frayling, I. M., Cooper, D. N., & Upadhyaya, M. (2017). The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Human Genomics*, 11(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40246-017-0109-3>
- Piotrowski, A., Xie, J., Liu, Y. F., Poplawski, A. B., Gomes, A. R., Madanecki, P., Fu, C., Crowley, M. R., Crossman, D. K., Armstrong, L., Babovic-Vuksanovic, D., Bergner, A., Blakeley, J. O., Blumenthal, A. L., Daniels, M. S., Feit, H., Gardner, K., Hurst, S., Kobelka, C., ... Messiaen, L. M. (2014). Germline loss-of-function mutations in LZTR1 predispose to an inherited disorder of multiple schwannomas. *Nature Genetics*, 46(2), 182–187. <https://doi.org/10.1038/ng.2855>
- Ribeiro, D., Klarqvist, M. D. R., Westermark, U. K., Oliynyk, G., Dzieran, J., Kock, A., Savatier Banares, C., Hertwig, F., Johnsen, J. I., Fischer, M., Kogner, P., Lovén, J., & Arsenian Henriksson, M. (2016). Regulation of Nuclear Hormone Receptors by MYCN-Driven miRNAs Impacts Neural Differentiation and Survival in Neuroblastoma Patients. *Cell Reports*, 16(4), 979–993. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.052>

- Riccardi, V. M. (1981). Von Recklinghausen neurofibromatosis. *The New England Journal of Medicine*, *305*(27), 1617–1627. <https://doi.org/10.1056/NEJM198112313052704>
- Sabbagh, A., Pasmant, E., Imbard, A., Luscan, A., Soares, M., Blanché, H., Laurendeau, I., Ferkal, S., Vidaud, M., Pinson, S., Bellanné-Chantelot, C., Vidaud, D., Parfait, B., & Wolkenstein, P. (2013). NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type I genotype-phenotype correlation: The French experience. *Human Mutation*, *34*(11), 1510–1518. <https://doi.org/10.1002/humu.22392>
- Sabbagh, A., Pasmant, E., Laurendeau, I., Parfait, B., Barbarot, S., Guillot, B., Combemale, P., Ferkal, S., Vidaud, M., Aubourg, P., Vidaud, D., & Wolkenstein, P. (2009). Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. *Human Molecular Genetics*, *18*(15), 2768–2778. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp212>
- Scala, M., Schiavetti, I., Madia, F., Chelleri, C., Piccolo, G., Accogli, A., Riva, A., Salpietro, V., Bocciardi, R., Morcaldi, G., Di Duca, M., Caroli, F., Verrico, A., Milanaccio, C., Viglizzo, G., Traverso, M., Baldassari, S., Scudieri, P., Iacomino, M., ... Zara, F. (2021). Genotype-Phenotype Correlations in Neurofibromatosis Type 1: A Single-Center Cohort Study. *Cancers*, *13*(8), 1879. <https://doi.org/10.3390/cancers13081879>
- Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Wiesmüller, L., Kabsch, W., Stege, P., Schmitz, F., & Wittinghofer, A. (1998). Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *The EMBO Journal*, *17*(15), 4313–4327. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.15.4313>
- Seizinger, B. R., Rouleau, G. A., Ozelius, L. J., Lane, A. H., Faryniarz, A. G., Chao, M. V., Huson, S., Korf, B. R., Parry, D. M., & Pericak-Vance, M. A. (1987). Genetic linkage of von Recklinghausen neurofibromatosis to the nerve growth factor receptor gene. *Cell*, *49*(5), 589–594. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90534-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90534-4)
- Shen, M. H., Harper, P. S., & Upadhyaya, M. (1996). Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *Journal of Medical Genetics*, *33*(1), 2–17. <https://doi.org/10.1136/jmg.33.1.2>
- Shih, Y.-T., & Hsueh, Y.-P. (2016). VCP and ATL1 regulate endoplasmic reticulum and protein synthesis for dendritic spine formation. *Nature Communications*, *7*, 11020. <https://doi.org/10.1038/ncomms11020>
- Shih, Y.-T., Huang, T.-N., Hu, H.-T., Yen, T.-L., & Hsueh, Y.-P. (2020). Vcp Overexpression and Leucine Supplementation Increase Protein Synthesis and Improve Fear Memory and Social Interaction of Nf1 Mutant Mice. *Cell Reports*, *31*(13), 107835. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107835>
- Stowe, I. B., Mercado, E. L., Stowe, T. R., Bell, E. L., Oses-Prieto, J. A., Hernández, H., Burlingame, A. L., & McCormick, F. (2012). A shared molecular mechanism underlies the human rasopathies Legius syndrome and Neurofibromatosis-1. *Genes & Development*, *26*(13), 1421–1426. <https://doi.org/10.1101/gad.190876.112>
- Sung, H., Hyland, P. L., Pemov, A., Sabourin, J. A., Baldwin, A. M., Bass, S., Teshome, K., Luo, W., Frederick National Laboratory for Cancer Research, Widemann, B. C., Stewart, D. R., & Wilson, A. F. (2020). Genome-wide association study of café-au-lait macule number in neurofibromatosis type 1. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, *8*(10), e1400. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1400>
- Szudek, J., Joe, H., & Friedman, J. M. (2002). Analysis of intrafamilial phenotypic variation in neurofibromatosis 1 (NF1). *Genetic Epidemiology*, *23*(2), 150–164. <https://doi.org/10.1002/gepi.1129>
- \* Tamura, R. (2021). Current Understanding of Neurofibromatosis Type 1, 2, and Schwannomatosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 5850. <https://doi.org/10.3390/ijms22115850>
- Thomas, L., Richards, M., Mort, M., Dunlop, E., Cooper, D. N., & Upadhyaya, M. (2012). Assessment of the potential pathogenicity of missense mutations identified in the GTPase-activating protein (GAP)-related domain of the neurofibromatosis type-1 (NF1) gene. *Human Mutation*, *33*(12), 1687–1696. <https://doi.org/10.1002/humu.22162>
- Tischfield, J. A. (1997). Loss of heterozygosity or: How I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *American Journal of Human Genetics*, *61*(5), 995–999. <https://doi.org/10.1086/301617>
- Titze, S., Peters, H., Währisch, S., Harder, T., Guse, K., Buske, A., Tinschert, S., & Harder, A. (2010). Differential MSH2 promoter methylation in blood cells of Neurofibromatosis type 1 (NF1) patients. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, *18*(1), 81–87. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.129>
- Tokuo, H., Yunoue, S., Feng, L., Kimoto, M., Tsuji, H., Ono, T., Saya, H., & Araki, N. (2001). Phosphorylation of neurofibromin by cAMP-dependent protein kinase is regulated via a cellular association of N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *FEBS Letters*, *494*(1–2), 48–53. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02309-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02309-2)
- Tonsgard, J. H., Yelavarthi, K. K., Cushner, S., Short, M. P., & Lindgren, V. (1997). Do NF1 gene deletions result in a characteristic phenotype? *American Journal of Medical Genetics*, *73*(1), 80–86. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19971128\)73:1<80::aid-ajmg16>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19971128)73:1<80::aid-ajmg16>3.0.co;2-n)
- Trahey, M., & McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science (New York, N.Y.)*, *238*(4826), 542–545. <https://doi.org/10.1126/science.2821624>
- Upadhyaya, M., Huson, S. M., Davies, M., Thomas, N., Chuzhanova, N., Giovannini, S., Evans, D. G., Howard, E., Kerr, B., Griffiths, S., Consoli, C., Side, L., Adams, D., Pierpont, M., Hachen, R., Barnicoat, A., Li, H., Wallace, P., Van Biervliet, J. P., ... Messiaen, L. (2007). An absence of cutaneous neurofibromas associated with a 3-bp inframe deletion in exon 17 of the NF1 gene (c.2970-2972 delAAT): Evidence of a clinically significant NF1

- genotype-phenotype correlation. *American Journal of Human Genetics*, 80(1), 140–151.  
<https://doi.org/10.1086/510781>
- Vallée, B., Doudeau, M., Godin, F., Gombault, A., Tchalikian, A., de Tauzia, M.-L., & Bénédicti, H. (2012). Nf1 RasGAP inhibition of LIMK2 mediates a new cross-talk between Ras and Rho pathways. *PLoS One*, 7(10), e47283.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047283>
- Vandenbroucke, I., Vandesompele, J., De Paepe, A., & Messiaen, L. (2002). Quantification of *NF1* transcripts reveals novel highly expressed splice variants. *FEBS Letters*, 522(1–3), 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02887-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02887-9)
- Volta, M., Calza, S., Roberts, A. M., & Roberts, R. G. (2010). Characterisation of the interaction between syndecan-2, neurofibromin and CASK: Dependence of interaction on syndecan dimerization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(2), 1216–1221. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.043>
- Wallace, M. R., Marchuk, D. A., Andersen, L. B., Letcher, R., Odeh, H. M., Saulino, A. M., Fountain, J. W., Brereton, A., Nicholson, J., & Mitchell, A. L. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: Identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4965), 181–186.  
<https://doi.org/10.1126/science.2134734>
- Wallis, D., Li, K., Lui, H., Hu, K., Chen, M.-J., Li, J., Kang, J., Das, S., Korf, B. R., & Kesterson, R. A. (2018). Neurofibromin (*NF1*) genetic variant structure-function analyses using a full-length mouse cDNA. *Human Mutation*, 39(6), 816–821. <https://doi.org/10.1002/humu.23421>
- Wang, H.-F., Shih, Y.-T., Chen, C.-Y., Chao, H.-W., Lee, M.-J., & Hsueh, Y.-P. (2011). Valosin-containing protein and neurofibromin interact to regulate dendritic spine density. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(12), 4820–4837. <https://doi.org/10.1172/JCI45677>
- \* Wang, W., Wei, C.-J., Cui, X.-W., Li, Y.-H., Gu, Y.-H., Gu, B., Li, Q.-F., & Wang, Z.-C. (2021). Impacts of NF1 Gene Mutations and Genetic Modifiers in Neurofibromatosis Type 1. *Frontiers in Neurology*, 12, 704639.  
<https://doi.org/10.3389/fneur.2021.704639>
- Way, G. P., Youngstrom, D. W., Hankenson, K. D., Greene, C. S., & Grant, S. F. (2017). Implicating candidate genes at GWAS signals by leveraging topologically associating domains. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 25(11), 1286–1289. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.108>
- Weiss, J. B., Weber, S., Marzulla, T., & Raber, J. (2017). Pharmacological inhibition of Anaplastic Lymphoma Kinase rescues spatial memory impairments in Neurofibromatosis 1 mutant mice. *Behavioural Brain Research*, 332, 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.024>
- Wertz, M. H., Mitchem, M. R., Pineda, S. S., Hachigian, L. J., Lee, H., Lau, V., Powers, A., Kulicke, R., Madan, G. K., Colic, M., Therrien, M., Vernon, A., Beja-Glasser, V. F., Hegde, M., Gao, F., Kellis, M., Hart, T., Doench, J. G., & Heiman, M. (2020). Genome-wide In Vivo CNS Screening Identifies Genes that Modify CNS Neuronal Survival and mHTT Toxicity. *Neuron*, 106(1), 76–89.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.004>
- White, R., Nakamura, Y., O'Connell, P., Leppert, M., Lalouel, J. M., Barker, D., Goldgar, D., Skolnick, M., Carey, J., & Wallis, C. E. (1987). Tightly linked markers for the neurofibromatosis type 1 gene. *Genomics*, 1(4), 364–367.  
[https://doi.org/10.1016/0888-7543\(87\)90040-1](https://doi.org/10.1016/0888-7543(87)90040-1)
- Woycinek Kowalski, T., Brussa Reis, L., Finger Andreis, T., Ashton-Prolla, P., & Rosset, C. (2020). Systems Biology Approaches Reveal Potential Phenotype-Modifier Genes in Neurofibromatosis Type 1. *Cancers*, 12(9), 2416.  
<https://doi.org/10.3390/cancers12092416>
- Wu, J., Keng, V. W., Patmore, D. M., Kendall, J. J., Patel, A. V., Jousma, E., Jessen, W. J., Choi, K., Tschida, B. R., Silverstein, K. A. T., Fan, D., Schwartz, E. B., Fuchs, J. R., Zou, Y., Kim, M.-O., Dombi, E., Levy, D. E., Huang, G., Cancelas, J. A., ... Ratner, N. (2016). Insertional Mutagenesis Identifies a STAT3/Arid1b/β-catenin Pathway Driving Neurofibroma Initiation. *Cell Reports*, 14(8), 1979–1990.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.074>
- Xie, K., Colgan, L. A., Dao, M. T., Muntean, B. S., Sutton, L. P., Orlandi, C., Boye, S. L., Boye, S. E., Shih, C.-C., Li, Y., Xu, B., Smith, R. G., Yasuda, R., & Martemyanov, K. A. (2016). NF1 Is a Direct G Protein Effector Essential for Opioid Signaling to Ras in the Striatum. *Current Biology*, 26(22), 2992–3003.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.010>
- Xu, G. F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., & White, R. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*, 62(3), 599–608.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90024-9)
- Yan, W., Markegard, E., Dharmaiyah, S., Urisman, A., Drew, M., Esposito, D., Scheffzek, K., Nissley, D. V., McCormick, F., & Simanshu, D. K. (2020). Structural Insights into the SPRED1-Neurofibromin-KRAS Complex and Disruption of SPRED1-Neurofibromin Interaction by Oncogenic EGFR. *Cell Reports*, 32(3), 107909.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107909>
- Yang, F.-C., Chen, S., Clegg, T., Li, X., Morgan, T., Estwick, S. A., Yuan, J., Khalaf, W., Burgin, S., Travers, J., Parada, L. F., Ingram, D. A., & Clapp, D. W. (2006). Nf1+/- mast cells induce neurofibroma like phenotypes through

- secreted TGF-beta signaling. *Human Molecular Genetics*, 15(16), 2421–2437.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddl165>
- Yang, K., Du, J., Shi, D., Ji, F., Ji, Y., Pan, J., Lv, F., Zhang, Y., & Zhang, J. (2020). Knockdown of MSI2 inhibits metastasis by interacting with caveolin-1 and inhibiting its ubiquitylation in human NF1-MPNST cells. *Cell Death & Disease*, 11(6), 489. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2703-x>
- Yap, Y.-S., McPherson, J. R., Ong, C.-K., Rozen, S. G., Teh, B.-T., Lee, A. S. G., & Callen, D. F. (2014). The NF1 gene revisited—From bench to bedside. *Oncotarget*, 5(15), 5873–5892. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2194>
- Young, L. C., Goldstein De Salazar, R., Han, S.-W., Huang, Z. Y. S., Merk, A., Drew, M., Darling, J., Wall, V., Grisshammer, R., Cheng, A., Allison, M. R., Sale, M. J., Nissley, D. V., Esposito, D., Ognjenovic, J., & McCormick, F. (2023). Destabilizing NF1 variants act in a dominant negative manner through neurofibromin dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(5), e2208960120.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2208960120>
- Zou, M.-X., Butcher, D. T., Sadikovic, B., Groves, T. C., Yee, S.-P., & Rodenhiser, D. I. (2004). Characterization of functional elements in the neurofibromatosis (NF1) proximal promoter region. *Oncogene*, 23(2), 330–339.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207053>