

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY

Mgr. Šárka Bendová

**Neurofibromatóza typu 1
a zárodečné mutace genu *NF1* u českých pacientů**

Disertační práce

Školitel: MUDr. Anna Křepelová, CSc.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

Souhlasím

Šárka Bendová

V Praze dne 12. 2. 2012

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce MUDr. Anně Křepelové, CSc. za vedení postgraduálního studia.

Veronice Obermajerové děkuji za pomoc s přípravou vzorků.

RNDr. Peterovi Vasovčákovi, Ph. D. a Prof. Ing. Zdeňku Sedláčkovi, DrSc. velmi děkuji za podporu a pomoc při dokončování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat všem spoluautorům, kolegům a mé rodině.

Disertační práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (GA UK 200072) a Ministerstva zdravotnictví ČR (MZOFNM2005)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3' UTR	3' nepřekládaná oblast (3' untranslated region)
AD	autozomálně dominantní typ dědičnosti
AF	pigmentace v podpažní či podkolenní oblasti (auxillary freckling)
AR	autozomálně recesivní typ dědičnosti
Amk	aminokyselina
b	buňka
CAL	skvrny barvy bílé kávy (café au lait)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CBD	vazebné místo pro kaveolin (caveolin binding domain)
cDNA	komplementární DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
CFC	kardio-facio-kožní syndrom (cardiofaciocutaneous syndrome)
CGH	komparativní genomová hybridizace
CNS	centrální nervový systém
CSRD	doména neurofibrominu bohatá na cystein a serin (cysteine-serine rich domain)
DHPLC	denaturační vysoce účinná kapalinová chromatografie (denaturing high performance liquid chromatography)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ERK	kináza regulovaná extracelulárním signálem (extracellular-signal-regulated kinase)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GAP	GTPázu aktivující protein
gDNA	genomová DNA
GDP	guanosin difosfát
GIST	gastrointestinální stromální tumory
GIT	gastrointestinální trakt
GRD	GAP doména neurofibrominu (GAP related domain)
GTP	guanosin trifosfát
HGMD	databáze zárodečných mutací člověka (The Human Gene Mutation Database)
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
JMML	juvenilní myelomonocytární leukémie
LCR	nízkofrekventní repetice (low copy repeat)
LN	Lischovy noduly
LOH	ztráta heterozygosity (loss of heterozygosity)
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MAS	syndrom střední aorty (mid - aortic syndrome)
MLPA	multiplex ligation - dependent probe amplification
MPNST	maligní nádor pochvy periferního nervu (malignant peripheral nerve sheath tumor)
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
mRNA	mediátorová RNA (messenger ribonucleic acid)
NF	neurofibromatóza
NF1	neurofibromatóza typu 1
NF1-PH	PH-like doména neurofibrominu (pleckstrin homology)
NF1-Sec	SEC14-like doména neurofibrominu

NF2	neurofibromatóza typu 2
NFNC	neuro-kardio-facio-kožní syndrom (neuro-cardio-facial cutaneous syndrome)
NFNS	NF1 - Noonanové syndrom
Nf	neurofibrom
NIH	Národní Institut Zdraví (National Institutes of Health)
NLS	jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal)
NMD	odstranění RNA transkriptů s nonsense mutací (nonsense mediated RNA decay)
ONG	gliom optického nervu (optic nerve glioma)
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PNS	periferní nervový systém
RAF	RAF signální dráha
RasGAP	Ras specifický GTPázu aktivující protein
Ras-MAPK	Ras-MAP signální dráha
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
SchC	Schwannova buňka
Tub	vazebná místa pro tubulin

OBSAH

1	Úvod.....	7
1.1	Neurofibromatóza typu 1 jako model dědičné nádorové predispozice.....	7
1.2	Historie NF1	7
1.3	Klinická kritéria	8
1.4	Diferenciální diagnostika.....	10
1.5	Gen <i>NF1</i>	12
1.5.1	Geny v intronu 27b	12
1.5.2	Promotor a 3' UTR	13
1.5.3	Pseudogeny	13
1.5.4	Alternativní sestřih.....	14
1.6	Protein neurofibromin.....	15
1.7	Modifikátorové geny.....	17
1.8	Mutace a jejich vliv.....	17
1.8.1	Korelace genotyp-fenotyp.....	18
1.8.1.1	Mikrodeleční syndrom NF1	18
1.8.1.2	Delece 3 bp v exonu 17.....	20
1.8.2	Somatické mutace	21
1.9	Terapie	22
2	Cíle práce	23
3	Publikace.....	24
4	Závěry	31
5	Literatura.....	33
6	Seznam příloh – vlastní publikace k tématu práce	39

1 Úvod

1.1 Neurofibromatóza typu 1 jako model dědičné nádorové predispozice

Nádorová onemocnění jsou v České republice druhou nejčastější příčinou úmrtí. Roční úmrtnost činí více než 27 tisíc osob, což představuje 23% z celkové úmrtnosti obyvatelstva ¹. Nádorová onemocnění mají významnou genetickou složku a každý jedinec nese individuální predispozici k jejich rozvoji. Hlavní příčinou rozvoje jednoho z onemocnění spojených s nádorovou predispozicí, neurofibromatózy typu 1 ([NF1](#)), je inaktivace tumor supresorového genu *NF1* (HGNC:7765; MIM 613113; RefSeq: NM_000267.3) zárodečnými mutacemi. Produkty tumor supresorových genů se uplatňují při regulaci buněčného cyklu a odpovědi na poškození genetické informace a vyřazení jejich funkce vede k abnormální proliferaci buněk, což v konečném důsledku způsobuje rozvoj nádorového bujení. Nádorová tkáň je pak tvořena shlukem nově vzniklých tkáňových útvarů nebo buněčných populací, vznikajících jako nefyziologická odezva na vnější i vnitřní podněty organismu, která se vymezuje z regulačního vlivu okolních buněk a jeví známky abnormality v mnoha směrech ². U tumor supresorových genů je výpadek funkce jedné mutované alely zpravidla kompenzován funkcí alely nemutované. Mnoho těchto genů tak má na buněčné úrovni recesivní charakter a k rozvoji nádorového onemocnění je nutná dle Knudsonovy dvojjásahové teorie inaktivace obou alel ³.

1.2 Historie NF1

Neurofibromatóza ([NF](#)) neboli von Recklinghausenova choroba byla poprvé detailně popsána v roce 1882 německým patologem stejného jména jako onemocnění predisponující ke vzniku tumorů nervového systému a abnormální kožní pigmentaci. Již v historii však byla spojována s popisem groteskního fenotypu, např. Morse poukazuje na kresbu muže majícího kožní noduly datovanou do 13. století nebo na románovou postavu Victora Huga Quasimodo ⁴.

První číselná klasifikace typů neurofibromatóz, založená na přítomnosti nebo absenci tzv. skvrn bílé kávy (café-au-lait, [CAL](#)), Lischových nodulů ([LN](#)), různých typů tumorů periferního nervu a dalších specifických rysech, byla popsána v roce 1982 ⁵. Toto pojetí klasifikace vyvolalo řadu diskuzí a v roce 1988 byla během National Institutes of Health ([NIH](#)) Consensus Conference nahrazena tzv. diagnostickými kritérii podle [NIH](#) ⁶, dodnes

rutinně akceptovanými v klinické praxi. K jasnému odlišení typů [NF](#) přispěly v 90. letech 20. století nálezy genů *NF1* na chromozomu 17 (17q11.2) ⁷ a *NF2* na chromozomu 22 (22q12.2) ^{8,9}. Neurofibromatóza začala být následně klasifikována jako onemocnění typu 1 ([NF1](#)) a typu 2 ([NF2](#)), přičemž oba typy lze jasně diagnostikovat na základě klinických i molekulárně genetických charakteristik ^{8,10}.

1.3 Klinická kritéria NF1

Kritéria podle [NIH](#) jsou splněna u jedince nesoucího dva a více následujících znaků:

- 6 a více skvrn bílé kávy větších než 5 mm v průměru u jedinců prepubertálního věku a větších než 15 mm v postpubertálním věku
- dva a více neurofibromů ([Nf](#)) nebo alespoň jeden plexiformní neurofibrom
- pigmentace v podpažní a podkolenní oblasti ([AF](#))
- gliom optického nervu ([ONG](#))
- kostní léze (např. sfenoidní dysplázie nebo pseudoartróza tibie)
- příbuzný prvního stupně splňující kritéria podle [NIH](#)

Kritéria podle [NIH](#) jsou spolehlivá především u dospělých pacientů, určení správné diagnózy u dětí bez pozitivní rodinné historie může být problematické. Pouze polovina postižených dětí mladších jednoho roku splňuje diagnostická kritéria, ale u většiny z nich dojde k jejich dosažení do osmého roku věku ¹¹.

[NF1](#) je při incidenci 1:3000 živě narozených dětí jedním z nejčastěji se vyskytujících autozomálně dominantních ([AD](#)) onemocnění u člověka ¹². U pacientů nacházíme širokou variabilitu znaků jak mezi jednotlivými členy rodiny, tak i mezi rodinami navzájem. Klinické důsledky onemocnění jsou proto velmi těžko predikovatelné. Výskyt závažných komplikací se zvyšuje s věkem. Maligní nádory pochvy periferního nervu ([MPNST](#)) a cévní problémy jsou nejčastějšími komplikacemi snižujícími průměrnou délku života až o 15 let ¹³. Přibližně 5% rodin s klinickými symptomy [NF1](#) lze zařadit do několika nealelických subtypů tohoto onemocnění (Tab. 1 a 2).

Tabulka 1. Systém klasifikace [NF1](#)

Diagnóza	Jiné označení	Frekvence onemocnění	Gen	CAL	Kožní pigmentace	Tumor periferního nervu	Oční nález	Další klinické znaky s vysokou frekvencí	
Typická NF1	von Recklinghausen periferní NF	1:3000	<i>NF1</i>	6 a více	ano	kožní, nodulární a plexiformní Nf	LN , ONG	poruchy učení a chování, predispozice ke vzniku malignit, kostní dysplázie, kardiovaskulární, pulmonární komplikace	
NF1 alelické subtypy	mikrodelece NF1	1:60000 (5% <i>NF1</i> mutací)	<i>NF1</i>	velký počet	ano	mnohočetné Nf , zvýšené riziko vzniku malignit		kardiovaskulární komplikace, kraniofaciální dysmorfismus, nadprůměrná výška postavy, poruchy učení, mentální retardace, abnormality tkání	
	del AAT exon 17	AD CAL	neznámá	<i>NF1</i>	6 a více	ano	ne	velmi zřídka LN	pouze pigmentace, velmi zřídka další komplikace (vyjma pulmonární stenózy)
	syndrom Watson		velmi nízká	<i>NF1</i>	6 a více	ano	velmi zřídka kožní Nf v dospělosti	velmi zřídka LN , ONG se nevyskytují	mírné poruchy učení, pulmonární stenóza
	segmentální NF1		1:36-40000	somatické mutace <i>NF1</i>	segmentální lokalizace	vzácně	vzácně	ne	ne
NF1 nealelické subtypy	syndrom Legius	AD CAL NF1 -like syndrom	neznámá	<i>SPRED1</i> (chrom. 15)	6 a více	ano	ne	ne	makrocefalie, poruchy učení, lipomy

Převzato z ¹²

[NF1](#) je spolu se syndromy Noonanové, LEOPARD, kardio-facio-kutánním ([CFC](#)) a Costello zahrnována do skupiny onemocnění nazývaných neuro-kardio-facio-kožní syndromy ([NFNC](#))¹⁴. Společnými znaky pacientů s touto diagnózou jsou poruchy učení, srdeční defekty, faciální dysmorfismus, malý vzrůst, makrocefalie a kožní anomálie. S onemocněním [NFNC](#) (vyjma [CFC](#)) vzniká celoživotní riziko zvýšeného výskytu malignit spojené s nálezy kauzálních mutací v evolučně konzervované dráze [Ras-MAPK](#)¹⁵.

1.4 Diferenciální diagnostika

Doposud bylo popsáno více než 100 hereditárních syndromů a abnormalit, které jsou charakterizovány typickými rysy [NF1](#). Ve výjimečných případech mohou i tito pacienti splňovat diagnostická kritéria podle [NIH](#). [NF1](#) pak může být vyloučena na základě přítomnosti dalších znaků. Přehled nejčastějších onemocnění připomínajících svými klinickými projevy [NF1](#) ukazuje Tab. 2.

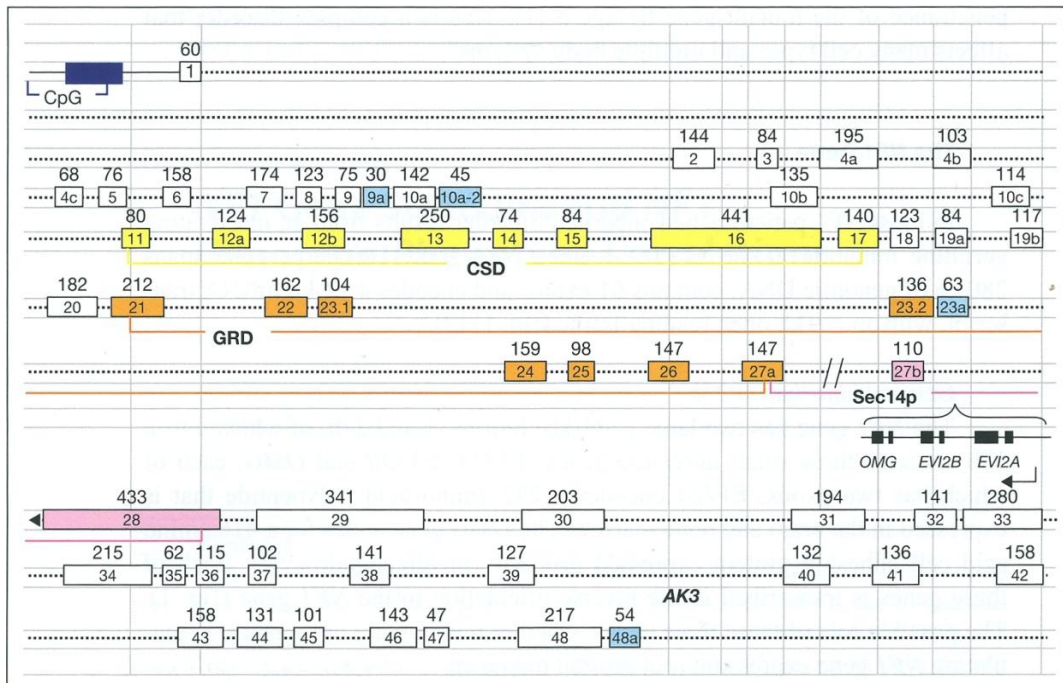
Tabulka 2. Onemocnění mající podobnost s [NF1](#) a jejich vzájemné odlišení pomocí klinických a histopatologických znaků.

Onemocnění	Klinické znaky
Legius syndrom – NF1 like	AD , mnohočetné CAL , AF , makrocefalie bez LN , Nf a tumorů CNS , heterozygotní mutace v genu <i>SPRED1</i>
HNPCC	Mnohočetné CAL , AF a kožní Nf spojené s výskytem malignit v neobvykle raném věku, homozygotní mutace v MMR genech. U rodičů častá konsangvinita a pozitivní rodinná historie HNPCC , žádný z nich nemívá typické znaky NF1
NF2	Oboustranné vestibulární schwannomy kraniálních a periferních nervů (pomocí MRI často k nerozeznání od intraneurálních plexiformních Nf), kožní schwannomy, meningiomy, juvenilní posteriorní subkapsulární katarakty, heterozygotní mutace v genu <i>NF2</i>
Schwannomatosis	Mnohočetné schwannomy kraniálních, spinálních nebo periferních nervů (pomocí MRI často k nerozeznání od intraneurálních plexiformních Nf), obvykle bez vestibulárních, očních nebo kožních znaků charakterizujících NF2 nebo NF1 , kauzální gen není znám
Noonanové syndrom	Malá postava, skolióza, vrozené srdeční defekty, široký krk s kožními řasami, mutace v genech <i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i> , <i>RAF1</i> , <i>SOS1</i>
LEOPARD syndrom	Četné kožní pigmentace, oční hypertelorismus, hluchota, vrozené srdeční defekty, malý vzrůst, mutace v genu <i>PTPN11</i>
McCune-Albright syndrom	Rozlehlé CAL , polyostotická fibrózní dysplázie, předčasná puberta, mutace v genu <i>GNAS1</i>
Mnohočetná endogenní neoplázie typu 2B	Mukózní neuromy, spojivkové neuromy, feochromocytom, medulární karcinom štítné žlázy, ganglioneuromatóza gastrointestinálního traktu, vzhled Marfanova syndromu, mutace v genu <i>RET</i>
Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrom	AD , četné lipomy a hemangiomy, makrocefalie, pigmentové skvrny na žaludu penisu, mutace v genu <i>PTEN</i>
Juvenilní hyalinní fibromatóza	AR , mnohočetné podkožní tumory, fibromatóza dásní, pomalý růst, kožní či podkožní noduly či pupínky bílé nebo pleťové barvy v obličeji, kůži hlavy a zádech, mutace v genu <i>CMG2</i>
Kongenitální generalizovaná fibromatóza	Mnohočetné kožní a podkožní tumory, tumory kosterního svalstva, kostí a vnitřností
Familiární mnohočetná lipomatóza	AD , mnohočetné podkožní lipomy, translokace genů <i>HMGIC</i> a <i>LLP</i>
Klippel-Trenaunay-Weber syndrom	Kožní hamangiomy, křečové žíly, arteriovenózní píštěle, hemihypertrofie
Proteus syndrom	Hamartomy, mateřská znaménka, hyperostóza, mutace v genech <i>PTEN</i> a <i>GPC3</i>
Mnohočetné CAL	AD znak bez dalších klinických projevů NF1
Parciální albinismus	Kožní pigmentace, depigmentace s hyperpigmentovanými okraji, místa s bílou kšticí

1.5 Gen *NF1*

Gen *NF1* se nachází na dlouhém raménku chromozomu 17 v oblasti q11.2. Zahrnuje 280 kb genomové DNA, skládá se z 61 exonů a kóduje 12 kb dlouhý transkript mRNA s 9 kb dlouhým otevřeným čtecím rámcem. Detailní struktura genu je zobrazena na Obr. 1.

Obrázek 1. Struktura genu *NF1*.



Jednotlivé exony jsou vyznačeny různobarevnými obdélníky, číselné označení nad nimi určuje jejich velikost v bp. Alternativní exony jsou označeny modře. Introny genu jsou značeny v reálném měřítku přerušovanou čarou (s výjimkou intronů 1 a 27b, které přesahují velikost 60 kb). Promotor genu je označen tmavě modrou barvou. Označeny jsou i funkční domény genu *NF1*: [CSD](#) – žlutá, [GRD](#) – oranžová, Sec14p – růžová. Geny v intronu 27b (*OMG*, *EVI2B*, *EVI2A*) jsou značeny černě. *AK3* – pseudogen v intronu 39.

Převzato z¹⁷.

1.5.1 Geny v intronu 27b

V sekvenci genu *NF1* se nacházejí 2 rozsáhlé introny, 1 a 27b. Oba přesahují svojí velikostí 60 kb. Intron 27b obsahuje 3 malé, sobě nepříbuzné geny, které jsou transkribovány v opačném směru vůči směru transkripce genu *NF1*. Geny *EVI2A*, *EVI2B* a *OMG* obsahují každý po 2 exonech a jejich individuální či společný vliv na

expresi genu *NF1* je dosud neznámý ¹⁷. Jejich proteinové produkty jsou exprimovány především v mozku (*EVI2A* a *OMG*) a v kostní dřeni (*EVI2A*). Produkt genu *OMG*, *OMGP*, je membránový glykoprotein exprimovaný v centrálním nervovém systému během procesu myelinizace a působí jako inhibitor proliferace neuronů a fibroblastů in vitro ¹⁸. Geny *EVI2A* a *EVI2B* jsou z velké části homologní s geny *Evi-2A* a *Evi-2B* myši a účastní se změn vedoucích k projevům leukémie. Přímá souvislost mezi geny *EVI2A*, *EVI2B* a výskytem leukémie u některých pacientů s [NF1](#) nebyla doposud prokázána.

1.5.2 Promotor a 3' UTR

Promotor genu *NF1* se nachází v evolučně vysoce konzervované oblasti nesoucí znaky CpG ostrůvku. Kauzální zárodečné ani somatické mutace nebyly doposud v této oblasti nalezeny ¹⁹. Hypermethylace tohoto CpG ostrůvku pravděpodobně není významným mechanismem somatické inaktivace žádné z alel genu *NF1* během vývoje tumorů typických pro [NF1](#) ²⁰.

Nepřekládaná 3' oblast ([3' UTR](#)) genu *NF1* je také vysoce evolučně konzervovaná a má velikost 3,5 kb. Hraje roli v regulaci stability [mRNA](#) a v kontrole efektivity její translace.

1.5.3 Pseudogeny

Pomocí fluorescenčně značené [cDNA](#) genu *NF1* bylo na sedmi chromozomech (2q12-q13, 12q11, 14p11-q11, 15q11.2, 18p11.2, 21p11-q11 a 22p11-q11) identifikováno více než 30 pseudogenů obsahujících minimálně z 90% podobnou sekvenci s genem *NF1* ²¹. Funkce těchto pseudogenů je inaktivována mutacemi všech typů nebo pouze částečnou duplikací genu *NF1* před interchromozomální transpozicí. Ačkoliv žádný z pseudogenů nekóduje funkční protein, jsou tyto vysoce homologické sekvence považovány za možné zdroje mutací ²². Velmi málo mutací nalezených v genu *NF1* však má svůj ekvivalent v homologních sekvencích pseudogenů, a tak je příspěvek interchromozomální genové konverze jako dalšího mutačního mechanismu u genu *NF1* sporný. Transkripční aktivita pseudogenů [NF1](#) na chromozomech 2, 15 a 21 může také komplikovat mutační analýzu funkčního genu *NF1* na úrovni [mRNA](#) ²³.

1.5.4 Alternativní sestřih

Alternativní sestřih hraje klíčovou roli v regulaci genů a umožňuje, aby z jednoho genu bylo odvozeno větší množství různých [mRNA](#), které dávají vznik odlišně fungujícím proteinům. Alternativní sestřih je nezbytný pro vytváření tkáňové specifiity a během vývoje a speciace obecně. Předpokládá se, že až 94% lidských genů podléhá tomuto mechanismu ²⁴. V nervové soustavě je jeho role významná především při formování synapsí a axonů či ve fyziologii membrán. Vysoce konzervovaný gen *NFI* obsahuje několik exonů (např. 9a, 10a2, 23a a 48a) podléhajících alternativnímu sestřihu. V jejich okolí bylo popsáno více než sto 4 až 6 nukleotidů dlouhých, vysoce konzervovaných UG či UA bohatých sekvencí, které slouží jako vazebná místa pro proteiny regulující alternativní sestřih. Například v intronové sekvenci umístěné před alternativním exonem 23a se nachází série UG bohatých motivů, které slouží jako vazebné místo proteinů CELF. CELF jsou [RNA](#) vazebné proteiny účastníci se hlavních posttranskripčních regulačních mechanismů. Rodina proteinů CELF je rozdělena podle homologie sekvencí na dvě podrodiny. Podrodinu 1 tvoří proteiny [CUG-BP1](#) (CELF1) a [ETR-3](#) (CELF2). Podrodina 2 zahrnuje CELF3 až CELF6. Jejich struktura je velmi konzervovaná, tvořená třemi RNA rozpoznávajícími doménami, které svými interakcemi s [mRNA](#) genu *NFI* přispívají k jeho alternativnímu sestřihu v mnoha tkáních (mozek, srdce, svaly).

Jednou z hlavních variant vznikajících alternativním sestřihem genu *NFI* je mRNA s přítomností exonu 23a v sekvenci genu. Transkripty genu *NFI* se tak objevují ve dvou hlavních isoformách, typ I (bez exonu 23a) a typ II (s exonem 23a). Exon 23a je součástí [GRD](#) domény neurofibrominu, jejíž funkce byla ve srovnání s ostatními doménami již mnohem lépe popsána. Přítomnost exonu 23a podporuje Ras-GAP aktivitu produktu kódovaného tímto transkriptem. Produkt kódovaný isoformou I má až 10x vyšší schopnost regulace signální dráhy onkogenu Ras a k jeho expresi dochází především v neuronech centrálního nervového systému dospělých jedinců ²⁵. Poměr isoform I a II je závislý na typu tkáně a stadiu vývoje organismu. Isoforma II se naopak nachází v mnoha tkáních s výjimkou neuronů.

Sestřih exonu 23a je vysoce konzervovaný a je podporovaný pěti ze šesti proteinů CELF ²⁶. Myši, u kterých byla uměle porušena rovnováha mezi isoformami I a II, vykazovaly signifikantní potíže s učením a pamětí. Rozdílná distribuce isoform byla také prokázána během raného embryonálního vývoje, kde jejich pozmeněné poměry

vedly u myši k srdečním anomáliím²⁷. Vyváženost obou isoform je tedy pro správnou funkci organismu nezbytná.

Proteiny CELF působí jako negativní regulátory přítomnosti exonu 23a v transkriptu genu *NF1*. Vazbou na UG bohaté oblasti intronové sekvence před exonem 23a blokují interakci faktoru [U2AF](#) s polypyrimidinovým traktem na 3' konci tohoto intronu. Brání tak vytvoření spliceosomu a včlenění exonu 23a do sekvence transkriptu. Vliv zvýšené exprese proteinů CELF v souvislosti s vynecháním exonu 23a popisuje ve své studii Barron²⁴.

Dalšími regulátory přítomnosti exonu 23a v transkriptu genu *NF1* jsou [mRNA](#) vázající proteiny TIA-1, TIAR a rodina proteinů Hu. Tyto proteiny se vážou na AU bohaté oblasti [RNA](#) v intronech obklopujících exon 23a²⁵.

1.6 Protein neurofibromin

Neurofibromin (RefSeq: NP_000258.1, UniProtKB P21359-2) je gigantický cytoplazmatický protein (2818 [Amino](#), 320 kDa) kódovaný genem *NF1*, přednostně exprimovaný v neuronech, Schwannových buňkách, oligodendrocytech, astrocytech a leukocytech. V nízkých koncentracích se exprimuje i v mnoha jiných tkáních²⁸⁻³¹. Jeho přítomnost v cytoplazmě byla zjištěna pomocí metod nepřímé imunofluorescence, diferencální centrifugace a glycerolového gradientu³². Vandebroucke et al.³³ zaznamenali v sekvenci kódované exonem 43 funkční jaderný lokalizační signál ([NLS](#)), který slouží jako signál k aktivnímu transportu proteinu do jádra skrze jaderné póry. Alternativní sestřih genu *NF1* bez přítomnosti exonu 43 (NF1deltaE43) se nachází pouze v cytoplazmě³³. Tato isoforma je vysoce exprimována v tkáních jako jsou fetální kosterní svalstvo, plíce, ledviny, játra a placenta, tedy v takových tkáních, které nemají přímou souvislost s onemocněním [NF1](#) a kde dochází ke snížené expresi neurofibrominu během pozdního fetálního a raného postnatálního vývoje. Nízká relativní exprese isoformy NF1deltaE43 v neurálních tkáních naznačuje pravděpodobnou důležitost přítomnosti [NLS](#) a vstupu neurofibrominu do jádra³⁴. Význam této isoformy však není doposud detailně objasněn.

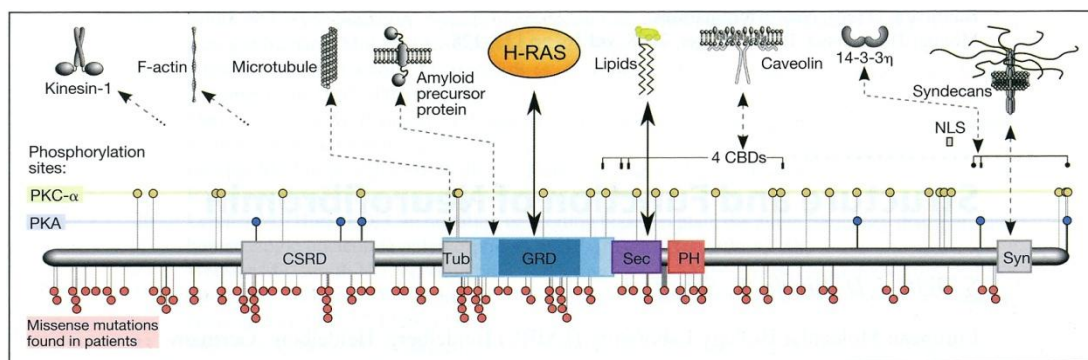
Aktivita neurofibrominu je u pacientů s [NF1](#) omezena. Protein zastává různé biochemické funkce včetně asociace s mikrotubuly a účastní se několika signálních drah ([MAPK](#), [cAMP](#))³⁵. Neurofibromin patří mezi členy velké rodiny vysoce evolučně konzervovaných proteinů, tzv. savčích [GTPázu](#) aktivujících proteinů ([GAP](#)). Ras-

specifické GTPázu aktivující proteiny ([RasGAP](#)) regulují biologickou aktivitu mnoha ostatních proteinů. Cytoplazmatický protein p21^{RAS} o velikosti 21 kDa je kódován geny *H-Ras*, *K-Ras* (Harvey a Kirsten murine sarcoma onkogeny virového původu) a *N-Ras* (lidský neuroblastomový onkogen) a hraje klíčovou roli v buněčné diferenciaci a růstu či v komunikaci mezi cytoplazmatickou membránou a jádrem. Protein p21^{RAS} je pomocí hydrolytické aktivity [GAP](#) konvertován ze své aktivní formy (p21^{RAS} – [GTP](#)) do formy inaktivní (p21^{RAS} – [GDP](#)). Aktivovaný p21^{RAS} interaguje s Raf-MEK-ERK ([MAPK](#)) signální drahou, která je zodpovědná za regulaci exprese genů podílejících se na kontrole buněčného cyklu, diferenciaci a migraci buněk. Mutace genů skupiny RAS spolu s haploinsuficiencí nebo úplnou absencí neurofibrominu jsou příčinou udržování p21^{RAS} v aktivním stavu, čímž dochází ke stálé stimulaci signální dráhy [MAPK](#) a následné proliferaci buněk. Snížená exprese neurofibrominu koreluje s množstvím aktivovaného p21^{RAS} v některých typech nádorů^{35,36}.

Katalytická aktivita neurofibrominu je zajišťována jeho centrální částí nazývanou [GRD](#), která je při počtu 60 aminokyselin kódována exony 20-27a. Mezi [GAP](#) patří také proteiny *Saccharomyces cerevisiae* IRA1 a IRA2, produkt genu *sar1* *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila* GAP1 a savčí p120^{GAP}. Všechny tyto proteiny vykazují značnou míru homologie s doménou [GRD](#) genu *NF1*. Spolu s doménami SEC14-like ([NF1-Sec](#), [Amk](#) 1560–1699) a PH-like ([NF1-PH](#), [Amk](#) 1713–1818) tvoří [GRD](#) jediné tři funkčně objasněné domény neurofibrominu. Ačkoliv bylo popsáno několik vazebných partnerů neurofibrominu, zůstává význam meziproteinových interakcí nejasný^{35,37}.

Neurofibromin také pozitivně reguluje intracelulární hladinu [cAMP](#). V [NF1](#)-deficientních buňkách je hladina [cAMP](#) výrazně snížena, což vede, např. v astrocytech, k inhibici buněčného růstu. Detailní strukturu neurofibrominu ukazuje Obr. 2.

Obrázek. 2. Struktura neurofibrominu



Obrázek dokresluje strukturu neurofibrominu popisovanou v textu, viz též seznam zkratk. Převzato z ³⁵.

1.7 Modifikátorové geny

Modifikátorové geny jsou geny mající vliv na expresi jiného genu. Žádný gen s těmito vlastnostmi ve vztahu ke genu *NF1* nebyl doposud jasně prokázán, ale jejich možná role je diskutována v souvislosti s fenotypovou variabilitou onemocnění.

Analýzou exprese fenotypových projevů typických pro *NF1*, od monozygotních dvojčat přes různé stupně příbuznosti v rámci jedné rodiny až po nepříbuzné pacienty z různých rodin, se zjistilo, že exprese *NF1* je do značné míry daná genotypem. Za možné modifikátorové geny jsou považovány geny, které sousedí s genem *NF1* a jsou spolu s ním inaktivovány mikrodelecemi nebo geny mající vliv na mitotickou rekombinaci, a tím také na míru ztráty heterozygosity (*LOH*) ³⁸. Vysvětlením vysoké inter- i intra-familiární variability fenotypu pacientů s *NF1* mohou být kromě modifikátorových genů také alelická heterogenita, mutace druhého zásahu, somatický mozaicismus, vliv prostředí nebo epigenetické změny ^{39,40}.

1.8 Mutace a jejich vliv

Dle databáze *HGMD* bylo doposud v genu *NF1* nalezeno 1300 kauzálních mutací ⁴¹. Jedná se o mutace bodové (missense, nonsense), posunové (inserce, delece, duplikace), sestříhové a velké genové přestavby. Žádná mutace regulačního charakteru nebyla doposud nalezena.

Přibližně 50% mutací v genu *NF1* vzniká během embryonálního vývoje probanda (*de novo*) a manifestují se pak jako sporadické případy onemocnění *NF1* v rodině ^{13,42}.

Způsob manifestace onemocnění nekoreluje s pohlavím ani etnikem probandů. Míra penetrance všech typů zárodečných mutací v genu *NF1* je 100% ¹².

Mezi nejčastější příčiny onemocnění [NF1](#) patří mutace vedoucí ke ztrátě funkce genu *NF1*. Více než 80% zárodečných mutací způsobuje posun čtecího rámce s následným vznikem předčasného terminačního kodonu ^{43,44}. Tento typ mutací je spojený především s absencí nebo sníženou mírou exprese mRNA ⁴⁵⁻⁴⁷. Missense, tiché mutace a in-frame varianty (delece resp. inserce jedné nebo více Aak), které nejsou zodpovědné za vznik předčasného terminačního kodonu, s velkou pravděpodobností ovlivňují terciární strukturu neurofibrominu, a tím i jeho správnou funkci ⁴⁸⁻⁵⁰.

Mutace jsou, nezávisle na typu, rovnoměrně rozptýleny podél celé kódující oblasti genu. Starší studie poukazují na kumulaci mutací ve funkčních doménách [GRD](#) a [CSRD](#) ^{44,51,52}, ale s přibývajícím množstvím nově detekovaných mutací tento trend nebyl v žádné současné studii potvrzen. V exonech podléhajících alternativnímu sestřihu (9b, 23a a 48a) nebyly doposud nalezeny žádné mutace ³⁴.

1.8.1 Korelace genotyp-fenotyp

Mnoho studií se u pacientů postižených [NF1](#) snažilo odhalit jasnou korelaci mezi jejich genotypem a fenotypem ^{12,53,54}. Široká intra- i inter-familiární variabilita fenotypu pacientů spolu se zvyšujícím se počtem nově nalezených mutací činí tuto problematiku vysoce žádanou, avšak její řešení zatím nepřineslo relevantní výsledky.

U pacientů s [NF1](#) byly doposud popsány pouze dvě mutace, jejichž vliv se zřetelně odráží ve fenotypu. První z nich je rozsáhlá delece genu *NF1* a přilehlých genů (tzv. mikroleční syndrom NF1) ⁵⁵, druhou je delece 3 bp v exonu 17 ⁵⁴.

1.8.1.1 Mikroleční syndrom NF1

Mikroleční syndrom NF1 je způsoben jednou ze dvou typických germinálních delecí genu *NF1*. Mikrolece typu I o velikosti 1,4 Mb se vyskytuje častěji a zahrnuje gen *NF1* a 14 dalších genů ⁵⁵. Její vznik je podmíněn interchromozomální nealelickou homologní rekombinací mezi oblastmi nízkofrekventních repetitiv (low copy repeats, [LCR](#)) NF1REPa a NF1REPC během maternální meiózy ^{56,57}. V této oblasti se nacházejí dvě preferovaná místa zlomů, PRS1 a PRS2 ^{55,58} (Obr. 3).

Mikrodelece typu II vzniká postzygotickou intrachromozomální nealeickou homologní rekombinací v průběhu mitózy, s body zlomu uvnitř genu *SUZ12* a jeho pseudogenu, a vede tak ke vzniku somatického mozaicismu⁵⁵. Zahrnuje 13 genů a má velikost 1,2 Mb. Její frekvence výskytu je nižší než u mikrodelece typu I a doposud byla popsána pouze u žen⁵⁸.

Tyto mikrodelece mají u pacientů s [NF1](#) přibližně 5% výskyt a každá z nich se projevuje specifickým fenotypem. Deletované geny jsou považovány za možné modifikátory genu *NF1*, které ve svém hemizygotním stavu a za současné ztráty genu *NF1* mají přímý vliv na fenotyp pacientů. Význam jednotlivých genů zatím nebyl přesně objasněn. Za příčinu poruch učení by mohla odpovídat haploinsuficience genů *OMG* a *CDK5R1*, geny *JJAZ1* a *CENTA2* hrají pravděpodobně roli ve vývoji kardiovaskulárních abnormalit^{59,60}.

Další studie prokázaly mikrodelece i jiných velikostí, jejich korelace s fenotypem však kvůli malému počtu pacientů není zřejmá. K detekci mikrodelecí se jako standardní metody využívají [FISH](#), [MLPA](#) a array [CGH](#)⁶¹.

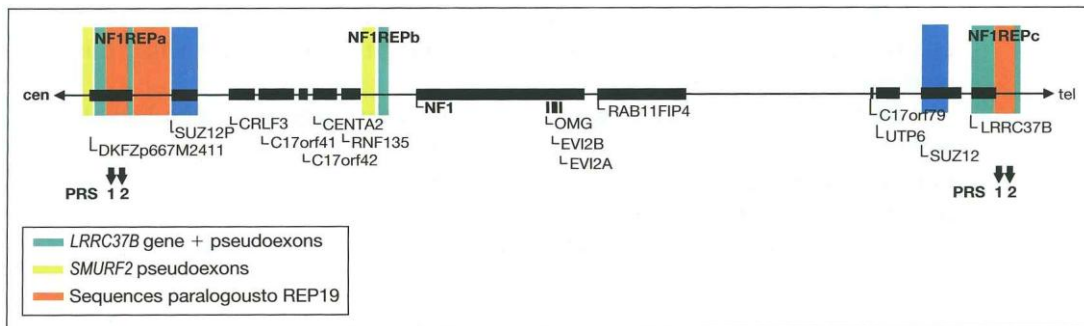
Gen *NF1* se nachází v oblasti bohaté na segmentální duplikace, což zvyšuje pravděpodobnost vzniku genomových přestaveb, jako jsou mikrodelece⁶². Ty obecně velmi často vznikají nealeickou homologní rekombinací mezi oblastmi [LCR](#). Genom člověka je z více jak 5% tvořen [LCR](#) o obvyklé délce 10-400 kb. [LCR](#) tak poskytují vhodné podmínky pro vznik delecí a duplikací segmentů nacházejících se mezi nimi. U pacientů s [NF1](#) nebyla doposud zaznamenána žádná duplikace zahrnující gen *NF1*⁵⁸.

V oblasti genu *NF1* se nacházejí tři [LCR](#) (NF1REPa, NF1REPB, NF1REPC), které mají vysoký stupeň homologie a hrají roli při vzniku mikrodelecí této oblasti. Sekvence NF1REPa se nachází ve vzdálenosti přibližně 400 kb od genu *NF1* směrem k centromere. Její součástí je několik duplikovaných exonů, které mají původ v genech *LRRC37B* (nachází se distálně od NF1REPC) a *SMURF2* (17q24). Tyto exony vytvářejí společný transkript DFKZp667M2411 s neznámou funkcí⁶³. NF1REPa a NF1REPC také obsahují úseky původně lokalizované v oblasti chromozomu 19p13.1. Tato oblast chromozomu 19 se nazývá REP 19⁶³. Další duplikovanou sekvencí je pseudogen *SUZ12*, který je umístěn distálně od NF1REPa. Jeho funkční zdrojový gen *SUZ12* se nachází v blízkosti NF1REPC. Protein kódovaný tímto genem patří do skupiny polykombinálních proteinů regulujících metylaci histonů a sestřih genů⁶⁴.

Oblast [LCR](#) je zajímavá i z evolučního hlediska. U myši nebyly v okolí genu *NF1* nalezeny žádné segmentální duplikace. Geny *NF1* u orangutana (*Pongo*) a makaka

rhesus (*Macaca mulatta*) neobsahují homologní sekvence k sekvenci REP 19. Zdá se tak, že transpozice paralogních sekvencí z chromozomu 19 na chromozom 17 nastala až po oddělení linií vedoucích k orangutanům a k modernímu člověku⁵⁵.

Obrázek 3. Oblasti s funkčním významem pro vznik mikroleceí genu *NF1*.



Geny nacházející se v oblastech NF1REPs a mezi nimi jsou značeny černou barvou. Místa s vysokou frekvencí rekombinace (PRS 1, 2) jsou značena černými šipkami. Převzato z⁶⁴.

1.8.1.2 Delece 3 bp v exonu 17

Druhou germinální mutací se známým vlivem na fenotyp pacientů s *NF1* je delece AAT v exonu 17 (c.2970_2972delAAT)⁵⁴. Pacienti s touto delecí mají mírnější projevy fenotypu *NF1*, nedochází u nich k rozvoji kožních, podkožních a superfaciálních plexiformních neurofibromů. Delece odstraní jeden ze dvou sousedících methioninů. Následná chybná fosforylace treoninového zbytku nacházejícího se ve vysoce evolučně konzervované oblasti má funkční vliv na vytváření 3D konformace a vazebných interakcí proteinu. Tato evolučně konzervovaná oblast, doména *CSRD*, je bohatá na množství serinových a cysteinových aminokyselinových zbytků, které tvoří vazebná místa pro *cAMP*, nezbytná pro správnou funkci buněčné signalizace¹⁷.

Z klinického hlediska je korelace genotypu této mutace s fenotypem zásadní především z důvodu absence neurofibromů. Neurofibromy přinášejí pacientům celoživotní zvýšené riziko rozvoje maligních tumorů periferních nervů⁵⁴. Předpokládá se, že tato varianta neurofibrominu s chybějícím methioninovým zbytkem (na rozdíl od jiných typů mutací v genu *NF1*) rozvoj neurofibromů nepodporuje. Neurofibromy jsou na buněčné úrovni velice heterogenní útvary, obsahující mimo bialelickými mutacemi postižené *Nf*^{-/-} Schwannovy buňky (nesoucí somatické mutace inaktivující divokou alelu) také

perineurální buňky, fibroblasty a žírné buňky pouze s heterozygotní $Nf^{+/-}$ zárodečnou mutací ⁶⁵. Na myších modelech [NF1](#) bylo prokázáno, že právě interakce mezi $Nf^{+/-}$ žírnými buňkami a $Nf^{-/-}$ Schwannovými buňkami je spouštěcím mechanismem rozvoje neurofibromů ⁶⁶. Za jejich absenci u pacientů s popisovanou delecí tedy může odpovídat přerušení interakce právě mezi těmito typy buněk ¹⁷. Tento typ delecí byl popsán také u pacientů s [NFNS](#). Předpokládá se, že tato mutace není v případě fenotypu [NFNS](#) kauzální, ale může k němu predisponovat ¹⁷. Protein SHP-2, produkt genu *PTPN11*, je upstreamovým aktivátorem onkogenu Ras a spolu s neurofibrominem se podílejí na správné funkci Ras-GTP signální dráhy. Mutace v genu *PTPN11* jsou nalézány zhruba u poloviny pacientů se syndromem Noonanové ⁶⁷. Široká variabilita hrubých rysů tváře pacientů je pravděpodobně ovlivněna dalšími modifikátorovými geny ⁵⁹.

1.8.2 Somatické mutace

Znalosti spektra somatických mutací genu *NF1* jsou oproti velmi dobře popsanému spektru zárodečných mutací malé. Neexistence aktualizované databáze somatických mutací tento stav dále podporuje ⁶⁸. Objasnění spektra somatických mutací je nezbytné pro porozumění klinické variability a pro pochopení mechanismu somatické inaktivace genu *NF1*.

Somatické mutace se v genu *NF1* mohou objevit v průběhu embryonálního vývoje jako mutace prvního zásahu a podílet se tak na vytvoření mozaicismu nebo mohou vzniknout jako mutace druhého zásahu a inaktivovat divokou alelu *NF1* u heterozygotního pacienta. Přehled neoplázií spojovaných se somatickými mutacemi genu *NF1* u heterozygotních pacientů ukazuje Tab. 3.

Tabulka 3. Neoplázie charakteristické pro [NF1](#) a typy somatických mutací

Typ tkáně	NF1 somatická mutace	Typ postižené buňky	Tkáňový původ	Embryonální původ
kožní Nf	bodové mutace, LOH	SchC	PNS	neurální lišta
plexiformní Nf	bodové mutace, LOH	SchC	PNS	neurální lišta
MPNST	LOH	SchC	PNS	neurální lišta
GIST	bodové mutace, LOH	Cajalovy intersticiální b	GIT	neurální lišta
JMML	LOH	prekurzorové myeloidní b	kostní dřeň	mesoderm
astrocytomy	LOH	astrocyty	CNS	ektoderm
feochromocytom	LOH	chromafinní b	žláza nadledvin	neurální lišta
pseudoartróza tibie	LOH	osteoblasty, osteocklasty	kost	mesoderm
CAL	bodové mutace	melanocyty	kůže	neurální lišta

Převzato z ⁶⁹.

1.9 Terapie

Projevy [NF1](#) se týkají mnoha klinických směrů: onkologických, neurologických, ortopedických, oftalmologických, kožních i psychiatrických. Některé znaky jako neprogresivní plexiformní neurofibromy a gliomy, asymptomatické gliomy, hypertenze či skolióza mohou přetrvávat bez klinických obtíží nebo působit pacientům jen drobné zdravotní obtíže. Chirurgická léčba je zaměřena především na řešení problémů spojených s lokalizací a rozvojem rozsáhlých, rychle rostoucích či bolestivých neurofibromů. Riziko recidivy plexiformních neurofibromů je 75% ⁷⁰. U progresivních nádorů [CNS](#) je vždy dle typu a rozvoje nálezu zvažována kromě chirurgické terapie i chemoterapie. Použití radioterapie není vhodné vzhledem k riziku malignizace benigních tumorů a potlačení růstu dětí mladších 5 let ^{70,71}.

Současný výzkum je zaměřen především na léky zpomalující či zastavující růst neurofibromů prostřednictvím stimulace signální dráhy [MAPK](#). Farnesyl transferázy podávané v kombinaci s inhibitory růstových faktorů (Lovastatin, Sorafenib, Rapamycin, Erlotinib) mají pozitivní vliv na inhibici růstu [MPNST](#) in vitro ⁷²⁻⁷⁴. V hippocampu myši se v důsledku ovlivnění neurotransmiterů neurofibrominem objevuje vyšší hladina [GABA](#). Tento efekt může vést k vysvětlení problémů s učením u pacientů s [NF1](#) ⁷⁵.

2 Cíle práce

Do roku 2004 probíhala na našem pracovišti diagnostika [NF1](#) u vybraných pacientů pouze na základě nepřímého genotypování pomocí intragenových markerů ^{76,77}. S rozrůstajícími se možnostmi vyšetřovacích molekulárně genetických metod jsme přistoupili k optimalizaci metod přímé mutační analýzy genu *NF1* a vyšetřování souboru pacientů, především v reprodukčním věku. Dílčí cíle práce byly:

1. Přímá mutační analýza genu *NF1* v souboru pacientů s familiárním a sporadickým výskytem [NF1](#).

Cílem bylo provést pomocí molekulárně genetických metod mutační analýzu zárodečných mutací v kódující oblasti genu *NF1*, v případě nálezu zárodečné kauzální mutace vyšetřit rodinné příslušníky probandů a potvrdit tak familiární či sporadický výskyt onemocnění v rodině. Na základě získaných dat pak popsat dosud nepublikované kauzální mutace a porovnat typy a spektra mutací v české populaci s publikovanými údaji.

2. Kompletní mutační a klinická analýza u pacientů se vzácnými či atypickými projevy NF1 a studium korelace genotypu s fenotypem.

Cílem bylo uskutečnit mutační analýzu genu *NF1* u pacientů s minoritními znaky NF1, odhalit možnou souvislost mezi typem kauzální mutace a daným fenotypovým projevem a popsat atypické projevy a porovnat variabilitu jejich manifestace u pacientů s NF1. Detailním studiem atypických případů tak přispět k obecnému pochopení mechanismů choroby.

3. Návrh optimálního molekulárně genetického vyšetřovacího algoritmu u pacientů s [NF1](#) a jeho uvedení do rutinní praxe.

Cílem bylo optimalizovat molekulárně genetické vyšetřovací metody a sestavit z nich optimální vyšetřovací algoritmus, který by umožňoval efektivní vyšetření velkého množství pacientů s [NF1](#) a porovnat několik dostupných vyšetřovacích metod z hlediska jejich časové a ekonomické náročnosti a efektivity záchytu mutací.

3 Publikace

Publikace 1

Bendova S, Krepelova A, Petrak B, Kinstova L, Musova Z, Rausova E, Marikova T.

Novel mutations in the NF1 gene in Czech patients with neurofibromatosis type 1.

J Mol Neurosci. 2007; **31**(3): 273-9.

IF: 2,72

V publikaci jsme zhodnotili výsledky mutační analýzy genu *NF1* u 22 nepříbuzných pacientů s [NF1](#) s familiárním i sporadickým výskytem onemocnění v rodině a u jejich rodinných příslušníků. Soubor byl sestaven na základě probandů splňujících diagnostická kritéria podle [NIH](#) pro [NF1](#) ⁶. Práce představovala první ucelený vyšetřený soubor pacientů s [NF1](#) v ČR. Mutační analýza vyžadovala, díky značné velikosti vyšetřovaného genu, náročnou optimalizaci molekulárně genetických metod, především metody [DHPLC](#), sloužící jako metoda preskriningu mutací v jednotlivých exonech. Úspěšnost nalezení mutace 75% byla srovnatelná s jinými pracemi ^{44,78}. Patnáct nalezených kauzálních mutací, z toho deset mutací dříve nepublikovaných, zahrnovalo mutace všech typů. Dvě tiché mutace neselegovaly s onemocněním a u jedné mutace typu missense nebyla prokázána její kauzalita (predikováno pomocí programu Polyphen) ⁷⁹. Žádná z kauzálních mutací nebyla v našem souboru nalezena opakovaně. Metodou [MLPA](#) jsme nezachytili žádnou rozsáhlou genomovou přestavbu genu *NF1*. Tyto přestavby jsou v genu *NF1* podle literatury zastoupeny maximálně u 5% postižených ⁶¹, a proto byla vzhledem k velikosti souboru pravděpodobnost detekce takové přestavby velmi malá. Dvě rozsáhlé genové přestavby již dříve detekované pomocí intragenových markerů ^{76,77} jsme metodou [MLPA](#) ověřili a lokalizovali až na úroveň jednotlivých exonů. Detailně jsme popsali fenotyp všech probandů, přičemž jsme mezi jejich genotypem a fenotypem nezaznamenali žádnou jasnou souvislost. Toto pozorování také odpovídalo dříve publikovaným údajům zjištěným na jiných velkých souborech, stejně tak jako spektrum námi nalezených mutací ^{52,61,80-82}.

Publikace 2

Petrak B, Bendova S, Seeman T, Klein T, Lisy J, Zatrapa T, Marikova T. **Mid-aortic syndrome with renovascular hypertension and multisystem involvement in a girl with familiar neurofibromatosis von Recklinghausen type 1.** *Neuro Endocrinol Lett.* 2007; **28**(6): 734-8.

IF: 1.312

Publikace popisuje velmi zřídka se objevující fenotyp doprovázející různá onemocnění, tzv. syndrom střední aorty ([MAS](#)). MAS je charakterizován segmentálním zúžením abdominální aorty a stenózou jejích hlavních větví, která vede k projevům renovaskulární hypertenze. Přibližně 15% těchto projevů je spojeno s [NF1](#)⁸³. Naše devítiletá pacientka se narodila z fyziologické gravidity bez zjevných poporodních obtíží. Již ve 4 měsících věku u ní však byl pozorován nerovnoměrný psychomotorický vývoj spolu s [CAL](#). Ve 3 letech byla u pacientky zjištěna stenóza abdominální aorty a stenózy obou renálních arterií. Její krevní tlak byl udržován v normě pouze pomocí medikace. V 9 letech byla u pacientky diagnostikovaná [NF1](#). V současné době pacientka trpí asymptomatickými bilaterálními [ONG](#), předčasnou pubertou, poruchou řeči, lehkou mentální retardací, hypotonickým syndromem a skoliózou. Ze znaků typických pro [NF1](#) se manifestovaly [CAL](#), [AF](#) a plexiformní neurofibrom. Otec probandky má rovněž hypertenzi, avšak vykazuje jen velmi mírný fenotyp [NF1](#). Naše práce detailně popisuje fenotyp této unikátní pacientky a komentuje variabilitu manifestace znaků u pacientů s [NF1](#). U probandky i jejího otce jsme našli shodnou kauzální mutaci v genu *NF1*. Insercí čtyř bází v exonu 34, c.6473_6474insGAAG, pravděpodobně vzniká předčasný terminační kodon a zkrácený genový produkt tak neplní svou původní biologickou funkci. Mutace nebyla doposud popsána v literatuře v žádné souvislosti s [MAS](#) ani s onemocněním [NF1](#). Její vliv na manifestaci konkrétních projevů [NF1](#) včetně [MAS](#) je tedy neznámý.

Publikace 3

Havlovicova M, Novotna D, Kocarek E, Novotna K, **Bendova S**, Petrak B, Hrdlicka M, Sedlacek Z. **A girl with neurofibromatosis type 1, atypical autism and mosaic ring chromosome 17.** *Am J Med Genet A.* 2007; **143**(1): 76-81.

IF: 2.505

Práce popisuje neobvyklý mechanismus vzniku [NF1](#) u pacientky, která byla postižena také psychomotorickou a růstovou retardací, středně těžkou mentální retardací, lehkou faciální dysmorfii, atypickým autismem a epilepsií. Dívka od narození vykazovala mongoloidní rysy, [CAL](#), depigmentaci břicha a opožděný psychomotorický vývoj. V raném kojeneckém období se přidaly problémy s příjmem potravy, neprospívání a ve 4 letech se objevila epilepsie. [NF1](#) byla u pacientky diagnostikována v 6,5 letech na základě [CAL](#), [AF](#) a skoliózy. U pacientky byla nalezena mozaika pro kruhový chromozom 17. Mozaicismus u pacientky vznikl nejspíše kvůli mitotické nestabilitě kruhového chromozomu a sestával z buněk s normálním a kruhovým chromozomem 17 a buněk s monosomií 17. Kruhový chromozom patří mezi vzácné nebalancované chromozomální aberace. Jeho vznik je podmíněn delecí distálních částí obou ramének, stočením se do kruhu a opětovným spojením volných konců. Existují dvě hypotézy o mechanismu působení kruhového chromozomu na fenotyp pacienta. Hypotéza kruhového chromozomu upřednostňuje samotnou kruhovou podstatu chromozomu před tím, o jaký konkrétní chromozom se jedná ⁸⁴. Druhá hypotéza naopak podporuje myšlenku, že fenotyp pacienta je specifický a určený obsahem genů konkrétního poškozeného chromozomu. V našem případě bylo otázkou, zda je fenotyp typický pro [NF1](#) důsledkem syndromu kruhového chromozomu, nebo zda souvisí se ztrátou jedné alely genu *NF1* v populaci monosomických buněk. Gen *NF1* se nachází ve velké vzdálenosti od zlomů kruhového chromozomu a nebyl tak při jeho vzniku deletován ani jinak ovlivněn. Přesto však nepřítomnost jedné jeho alely v monosomické linii (12% buněk) mohla způsobit manifestaci znaků [NF1](#). K obdobným závěrům došli i jiní autoři v souvislosti s mozaicismem monosomie chromozomu 22 u [NF2](#) ⁸⁵. Ve vztahu k [NF1](#) pacientka nemanifestovala v době vyšetření žádné příznaky vedoucí k onkologickým změnám (kožní a plexiformní [Nf](#), [LN](#), [ONG](#)). Absence jedné alely genů *TP53* a *BRCA1* v monosomické linii u ní ale může zvýšit riziko predispozice ke vzniku nádorů spojených se zárodečnými defekty v těchto genech.

Publikace 4

Snajderova M, Riccardi V. M, Petrak B, Zemkova D, Zapletalova J, Mardesic T, Petrakova A, Lanska V, Marikova T, **Bendova S**, Havlovicova M, Kaluzova M. **The Importance of Advanced Paternal Age in the Origin of Neurofibromatosis Type 1.** *Am J Med Genet A*. 2012 Epub ahead of print

IF: 2.505

Souvislost mezi pokročilým paternálním věkem při početí a zvýšeným rizikem vzniku zárodečné mutace u potomstva byla prokázána v mnoha studiích^{86,87}. V případě [NF1](#) je však tato otázka stále velmi diskutabilní a autoři prací docházejí k rozdílným závěrům^{82,88,89}. Podle Jadayel et al. má až 90% bodových mutací paternální původ⁸⁹. Mužské pohlavní buňky jsou v průběhu spermatogeneze vystaveny faktorům vedoucím ke kumulaci bodových mutací a jsou tak pravděpodobným zdrojem evolučních změn včetně těch směřujících od vyšších primátů k modernímu člověku⁹⁰. Naše práce analyzuje věk rodičů 103 sporadických probandů v době jejich narození. Všichni pacienti splňovali diagnostická kritéria podle [NIH](#)⁶, ale nebyla u nich zaznamenána pozitivní historie [NF1](#) v rodině. Těchto 103 sporadických pacientů tvoří 35,6% z celkového počtu všech pacientů s [NF1](#) evidovaných ve FN Motol. Dvacet probandů bylo vyšetřeno molekulárně genetickými metodami a u 13 z nich byla v genu *NF1* nalezena kauzální mutace. Tito pacienti byli primárně vyšetřeni v rámci mutačních analýz prezentovaných v publikacích 1 a 6. Absence mutace u rodičů byla u všech pacientů potvrzena cíleným vyšetřením příslušných exonů genu *NF1*. Limitovaný počet pacientů se známou kauzální mutací neumožnil podrobnější statistické zpracování korelace věku rodičů a genotypu pacientů. Průměrný paternální věk v době narození potomka převyšoval republikový průměr věku otců v běžné populaci o 3,2 roky. Jiní autoři uvádějí průměrné navýšení paternálního věku oproti běžné populaci o 1,9 – 4,5 roku^{82,88}. Průměrný maternální věk v době porodu byl oproti průměru běžné populace navýšen o 1,7 roků. Studie potvrdila hypotézu, že průměrný věk otců v době narození potomka s *NF1* je oproti průměru v běžné populaci signifikantně zvýšen. Potvrzení sporadického výskytu onemocnění ve všech rodinách ze souboru na molekulární úrovni a následná identifikace maternálního či paternálního původu detekovaných mutací by měla být předmětem dalšího řešení této problematiky.

Frekvence výskytu onemocnění [NF1](#) bez pozitivní rodinné anamnézy je uváděna v mnoha studiích mezi 30 - 50% ^{13,91}. Studie publikované před zavedením rutinního vyšetření genu *NF1* nezohledňovaly možnost nerozpoznání familiárního typu onemocnění u mírnějších fenotypů v důsledku intrafamiální variability. Předpoklad sporadického výskytu onemocnění dosahujícího až 50% tak mohl být nadhodnocen.

Publikace 5

Kalužová M, Petrák B, Lisý J, Vaculík M, **Bendová Š.**

Idiopatická stenosa akveduktu a porucha vývoje řeči u dětí s neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1. Přípravovaný rukopis

Práce popisuje dvě kazuistiky, jejichž společným rysem je rozvoj hydrocefalu při idiopatické stenóze akveduktu a porucha vývoje řeči u pacientů s [NF1](#). Hydrocefalus se u pacientů s [NF1](#) vyvíjí sekundárně během procesu expanzivního vývoje mozku nebo při idiopatické stenóze distální části akveduktu. Neverbální a verbální poruchy vývoje řeči jsou popisovány u 30-60% dětí s [NF1](#) ¹³.

U pětiletého chlapce byla na základě kožních změn, mentální retardace, poruch vývoje řeči a skoliózy diagnostikovaná [NF1](#). [MRI](#) mozku určila bilaterální [ONG](#). Pacient se narodil z fyziologické gravidity, poporodní adaptace byla od počátku poznamenána poruchami spánku a nerovnoměrným psychomotorickým vývojem, který ve 3 letech vyústil v epileptické záchvaty. V 7 letech byl na základě změn v charakteru epileptických záchvatů odhalen dekompenzovaný supratentoriální hydrocefalus na podkladě stenózy distální části akveduktu. Během akutního neurologického řešení stavu byl zaveden vnitřní zkrat. I nadále přetrvává postupné zhoršování mentální retardace a kvality řeči.

Osmiletá dívka byla hospitalizovaná ve FN Motol na základě poruch vývoje řeči a bolestí hlavy. Narodila se z fyziologické gravidity s normální poporodní adaptací. [CAL](#) byly patrné od narození. Ke zhoršení vývoje řeči došlo po 4. roce života. [MRI](#) mozku ukázala nález supratentoriálního hydrocefalu s nápadným zúžením terminální části dilatovaného mokovodu. Gliomy optických nervů ani chiasmatu nebyly rozpoznány. Během následujících 11 let sledování pacientky nedošlo k dekompenzaci hydrocefalu ani ke vzniku nádoru mozku, ale ani ke zlepšení kvality řeči.

Srovnání těchto dvou případů dokládá, že těžká porucha vývoje řeči by měla sloužit jako indicie vzniku pozvolna se rozvíjející stenózy distální části akveduktu s následným rozvojem hydrocefalu. Současně by měla být indikací k provedení [MRI](#) mozku pacienta včetně průtoku mozkomíšního moku akveduktem.

U obou pacientů byla provedena molekulárně genetická analýza a v genu *NF1* byly nalezeny kauzální mutace. U chlapce byla v exonu 4b identifikována mutace typu missense, c.647T>C. Mutace je příčinou vzniku nefunkčního genového produktu. Jedná se o mutaci dříve popsanou v literatuře, avšak bez souvislosti s námi popisovaným fenotypem. U dívky byla nalezena kauzální mutace v exonu 29, c.5220delT. Mutace byla prvně popsána v souvislosti s touto pacientkou. Její charakter způsobuje vznik předčasného terminačního kodonu vedoucího k ukončení translace. Pokud genový produkt vzniká, je zkrácený a nezastává svoji primární funkci. Obě mutace jsou rozdílné povahy a nelze tak na základě jejich nálezu určit původ vzniku stenózy akveduktu u popisovaných pacientů.

Publikace 6

Bendova S, Vasovcak P, Sedlacek Z, Marikova T, Kaluzova M, Petrak B, Krepelova A. RNA-based mutational analysis of Czech patients suspected of NF1 as an efficient alternative for less sensitive DHPLC pre-screening. Přípravovaný rukopis

V této publikaci diskutujeme panel zárodečných mutací v genu *NF1* nalezených za použití kombinace několika vyšetřovacích metod a srovnáváme je s dostupnou literaturou. Sledovaný soubor tvořilo 44 nepříbuzných pacientů splňujících diagnostická kritéria podle [NIH](#) pro [NF1](#). Třicet z nich byly sporadické případy.

Vyšetřovací schéma založené výlučně na kombinaci metod [DHPLC](#) a [MLPA](#) (publikace 1), vedlo k odhalení zárodečné mutace u 37,9% případu. Nízká míra detekce (ve srovnání s literaturou ^{44,78,92,93}) nás vedla k implementaci vyšetřovací metody založené na mutační analýze RNA. Navzdory v literatuře popisované 95% detekční úspěšnosti této metodiky ^{94,95} jsme dosáhli 81,5% úspěšnosti. Tento výsledek může být ovlivněn skladbou vyšetřovaného souboru, provozními podmínkami sběru a zpracováním krevních vzorků, zřídka se vyskytujícími balancovanými translokacemi ⁹⁴, epigenetickými mechanismy nebo hypermetylací promotoru genu *NF1* ^{96,97}. Soubor ale především zahrnuje pacienty již bez nálezu, vyšetřené metodou [DHPLC](#), kteří nemusí

být nosiči kauzálních mutací v genu *NF1* nebo se u nich jedná o mutace zvláště obtížně odhalitelné. Především u pacientů se somatickým mozaicismem může být úspěšnost nalezení mutace rovněž ovlivněna časovou prodlevou ve zpracování vzorků^{94,98}.

Celkem bylo u 44 pacientů nalezeno 33 kauzálních zárodečných mutací všech typů, z nich 18 doposud nepopsaných. Nezaznamenali jsme žádnou jasnou souvislost mezi fenotypem a genotypem pacientů. Patogenita missense mutací byla predikována pomocí programu Polyphen⁷⁹. Ve srovnání s literaturou⁹⁹ jsme v souboru zaznamenali vyšší zastoupení posunových mutací (52% vs. 26%) a nižší zastoupení missense mutací (3% vs. 18%). Relativně nízký počet pacientů nám neumožňuje přesnější objasnění tohoto jevu. Ve dvou případech jsme zaznamenali somatický mozaicismus. Tito dva pacienti byli postiženi klasickou formou [NF1](#), lišili se pouze v pozdější manifestaci [CAL](#). Předpokládáme, že většina nalezených zárodečných mutací v tomto souboru je paternálního původu. S pokročilým paternálním věkem při početí potomka pravděpodobně roste riziko vzniku zárodečné mutace⁸². Průměrný věk otců v době narození potomka převyšoval republikový průměr běžné populace o 1,7 roku a průměrný věk matek o 2,3 roky. Tato data jsou také součástí souboru 103 pacientů potvrzujících tento trend (publikace 4).

Preskrínigovou metodu [DHPLC](#) jsme nahradili mutační analýzou na úrovni RNA, na kterou v případě negativního výsledku navazuje metoda [MLPA](#). RNA analýza také umožňuje sledování vlivu mutací zachycených na úrovni genomové DNA a hodnocení jejich funkčního významu tam, kde není jasný (missense a tiché mutace). Vypracované vyšetřovací schéma je ve všech směrech efektivnější než použití kombinace metod [DHPLC](#) a [MLPA](#).

4 Závěry

V práci předkládáme rozbor mutační analýzy genu *NF1*, která byla provedena u 67 pacientů splňujících diagnostická kritéria tohoto onemocnění. Zachytili jsme 51 kauzálních zárodečných mutací všech typů, z toho 33 mutací bylo nových, v literatuře dosud nepopsaných. Mezi nalezenými mutacemi nebyla žádná rekurentní. Dvě tiché mutace neselegovaly s onemocněním a u jedné mutace typu missense nebyla prokázána její kauzalita. V rodinách s nalezenou kauzální mutací u probanda jsme vyšetřili i další rodinné příslušníky a potvrdili tak sporadický či familiární výskyt onemocnění [NF1](#) v rodině. Ve shodě s literaturou, která poukazuje na absenci jasné korelace genotyp-fenotyp u [NF1](#), nemůže být žádná z nalezených kauzálních mutací dána do přímé souvislosti s konkrétním fenotypem onemocnění u nosiče dané mutace. Pro účely efektivní mutační analýzy jsme optimalizovali řadu molekulárně genetických metod a porovnali jejich účinnost z hlediska výtěžnosti dat. Nejlepší výsledky jsme zaznamenali pomocí metody založené na izolaci [mRNA](#) a přímé sekvenaci [cDNA](#).

Zabývali jsme se také hypotetickou souvislostí mezi pokročilým věkem otců a zvýšeným rizikem vzniku zárodečné mutace u potomků se sporadickým výskytem [NF1](#) v rodině. Analýzou věku rodičů v době narození potomka jsme u 103 probandů zjistili, že věk otců i matek je oproti věku v běžné populaci signifikantně zvýšen. Sporadické případy onemocnění tvořily 35,6% všech pacientů s [NF1](#) evidovaných ve FN Motol. Toto zastoupení je v souladu se spodní hranicí frekvence výskytu sporadických případů uváděných v literatuře.

Popsali jsme několik zajímavých fenotypů manifestovaných v rámci [NF1](#). U devítileté pacientky jsme zaznamenali velmi zřídka se vyskytující syndrom střední aorty. U probandky i jejího otce jsme našli kauzální mutaci v genu *NF1*, popsali jsme detailně fenotyp pacientky a diskutovali variabilitu manifestace znaků ve srovnání se širokou populací pacientů s [NF1](#).

Další popisovaná pacientka byla mozaikou buněk s jedním normálním a jedním kruhovým chromozomem 17 a buněk s monosomií 17. Právě tato monosomická linie mohla u pacientky vést k projevům [NF1](#). Ačkoliv v době vyšetření probandka nemanifestovala žádné klinické znaky vedoucí k onkologickým změnám, absence jedné alely genů *TP53* a *BRCA1* v mozaice může u pacientky zvýšit i riziko nádorů spojených se zárodečnými defekty v těchto genech.

U dvou nepříbuzných pacientů s [NF1](#) jsme popsali rozvoj hydrocefalu při idiopatické stenóze akveduktu a poruchu vývoje řeči. Na příkladu těchto pacientů uvádíme, že těžká porucha vývoje řeči by měla sloužit jako indicie pozvolna se rozvíjející stenózy distální části akveduktu s následným rozvojem hydrocefalu. U obou pacientů jsme našli kauzální mutaci v genu *NF1*.

5 Literatura

1. SZU. <http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni> Accessed, 2011.
2. Lynch HT, Shaw TG, Lynch JF. Inherited predisposition to cancer: a historical overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004;129C(1):5-22.
3. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-3.
4. Morse R. Neurofibromatosis type 1. *Arch Neurol.* 1999;56:364-5.
5. Riccardi VM, Riccardi SL. Von Recklinghausen neurofibromatosis: new perspectives. *Tex Med.* 1982;78(1):43-4.
6. Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol.* 1988;45(5):575-8.
7. Barker D, Wright E, Nguyen K, et al. Gene for von Recklinghausen neurofibromatosis is in the pericentromeric region of chromosome 17. *Science.* 1987;236(4805):1100-2.
8. Viskochil D, Carey JC. Nosological considerations of the neurofibromatoses. *J Dermatol.* 1992;19(11):873-80.
9. Wertelecki W, Rouleau GA, Superneau DW, et al. Neurofibromatosis 2: clinical and DNA linkage studies of a large kindred. *N Engl J Med.* 1988;319(5):278-83.
10. Gutmann DH, Haipek CA, Hoang Lu K. Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein, merlin, forms two functionally important intramolecular associations. *J Neurosci Res.* 1999;58(5):706-16.
11. DeBella K, Szudek J, Friedman JM. Use of the national institutes of health criteria for diagnosis of neurofibromatosis 1 in children. *Pediatrics.* 2000;105(3 Pt 1):608-14.
12. Huson SM. The neurofibromatoses: Classification, Clinical Features and Genetic Counselling. Kaufmann(ed): Neurofibromatoses, Monogr Hum Genet, Basel, Karger. Volume 16, 2008:21-31.
13. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics.* 2009;123(1):124-33.
14. Denayer E, Legius E. What's new in the neuro-cardio-facial-cutaneous syndromes? *Eur J Pediatr.* 2007;166(11):1091-8.
15. Stevenson D. Neurofibromatosis type 1 and other syndromes of the Ras pathway Kaufmann(ed): Neurofibromatoses, Monogr Hum Genet, Basel, Karger Volume 16, 2008:32-5.
16. Jett K, Friedman JM. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med.* 2010;12(1):1-11.
17. Upadhyaya M. NF1 Gene Structure and NF1 Genotype/Phenotype Correlations. Kaufmann(ed): Neurofibromatoses, Monogr Hum Genet, Basel, Karger. Volume 16, 2008:46-62.
18. Trovo-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet.* 2006;70(1):1-13.
19. Horan MP, Osborn M, Cooper DN, Upadhyaya M. Functional analysis of polymorphic variation within the promoter and 5' untranslated region of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Am J Med Genet A.* 2004;131(3):227-31.
20. Horan MP, Cooper DN, Upadhyaya M. Hypermethylation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promoter is not a common event in the inactivation of the NF1 gene in NF1-specific tumours. *Hum Genet.* 2000;107(1):33-9.

21. Fantes JA, Mewborn SK, Lese CM, et al. Organisation of the pericentromeric region of chromosome 15: at least four partial gene copies are amplified in patients with a proximal duplication of 15q. *J Med Genet.* 2002;39(3):170-7.
22. Luijten M, Wang Y, Smith BT, et al. Mechanism of spreading of the highly related neurofibromatosis type 1 (NF1) pseudogenes on chromosomes 2, 14 and 22. *Eur J Hum Genet.* 2000;8(3):209-14.
23. Yu H, Zhao X, Su B, et al. Expression of NF1 pseudogenes. *Hum Mutat.* 2005;26(5):487-8.
24. Barron VA, Zhu H, Hinman MN, Ladd AN, Lou H. The neurofibromatosis type I pre-mRNA is a novel target of CELF protein-mediated splicing regulation. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(1):253-64.
25. Zhu H, Hinman MN, Hasman RA, Mehta P, Lou H. Regulation of neuron-specific alternative splicing of neurofibromatosis type 1 pre-mRNA. *Mol Cell Biol.* 2008;28(4):1240-51.
26. Yunoue S, Tokuo H, Fukunaga K, et al. Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GTPase-activating protein function toward Ras. *J Biol Chem.* 2003;278(29):26958-69.
27. Huynh DP, Nechiporuk T, Pulst SM. Differential expression and tissue distribution of type I and type II neurofibromins during mouse fetal development. *Dev Biol.* 1994;161(2):538-51.
28. Le LQ, Parada LF. Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene.* 2007;26(32):4609-16.
29. McClatchey AI, Cichowski K. Mouse models of neurofibromatosis. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1471(2):M73-80.
30. Viskochil D, White R, Cawthon R. The neurofibromatosis type 1 gene. *Annu Rev Neurosci.* 1993;16:183-205.
31. Zhu Y, Romero MI, Ghosh P, et al. Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes Dev.* 2001;15(7):859-76.
32. DeClue JE, Zhang K, Redford P, Vass WC, Lowy DR. Suppression of src transformation by overexpression of full-length GTPase-activating protein (GAP) or of the GAP C terminus. *Mol Cell Biol.* 1991;11(5):2819-25.
33. Vandenbroucke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen L. Neurofibromin is actively transported to the nucleus. *FEBS Lett.* 2004;560(1-3):98-102.
34. Vandenbroucke I, Vandesompele J, De Paepe A, Messiaen L. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. *FEBS Lett.* 2002;522(1-3):71-6.
35. Welti S. Structure and Function of Neurofibromin. Kaufmann(ed): Neurofibromatoses, Monogr Hum Genet, Basel, Karger. Volume 16, 2008:113-28.
36. Lau N, Feldkamp MM, Roncari L, et al. Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000;59(9):759-67.
37. Phan VT, Ding VW, Li F, Chalkley RJ, Burlingame A, McCormick F. The RasGAP proteins Ira2 and neurofibromin are negatively regulated by Gpb1 in yeast and ETEA in humans. *Mol Cell Biol.* 2010;30(9):2264-79.
38. Serra E, Rosenbaum T, Nadal M, et al. Mitotic recombination effects homozygosity for NF1 germline mutations in neurofibromas. *Nat Genet.* 2001;28(3):294-6.

39. Scalzone M, Coccia P, Ruggiero A, Riccardi R. Neurofibromatosis type 1 clinical features and management. *Pediatr Med Chir.* 2009;31(6):246-51.
40. Rieley MB, Stevenson DA, Viskochil DH, Tinkle BT, Martin LJ, Schorry EK. Variable expression of neurofibromatosis 1 in monozygotic twins. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(3):478-85.
41. Cooper DN, Ball EV, Stenson PD, Phillips AD, Shaw K, Mort ME. 2012;www.hgmd.org.
42. Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet.* 1989;26(11):704-11.
43. Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet.* 1996;33(1):2-17.
44. Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, et al. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet.* 2000;66(3):790-818.
45. Hamosh A, Trapnell BC, Zeitlin PL, et al. Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 1991;88(6):1880-5.
46. Hoffmeyer S, Assum G, Kaufmann D, Krone W. Unequal expression of NF1 alleles. *Nat Genet.* 1994;6(4):331.
47. Ainsworth P, Rodenhiser D, Stuart A, Jung J. Characterization of an intron 31 splice junction mutation in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Mol Genet.* 1994;3(7):1179-81.
48. Stark M, Assum G, Krone W. A small deletion and an adjacent base exchange in a potential stem-loop region of the neurofibromatosis 1 gene. *Hum Genet.* 1991;87(6):685-7.
49. Shen MH, Harper PS, Upadhyaya M. Neurofibromatosis type 1 (NF1): the search for mutations by PCR-heteroduplex analysis on Hydrolink gels. *Hum Mol Genet.* 1993;2(11):1861-4.
50. Tassabehji M, Strachan T, Sharland M, et al. Tandem duplication within a neurofibromatosis type 1 (NF1) gene exon in a family with features of Watson syndrome and Noonan syndrome. *Am J Hum Genet.* 1993;53(1):90-5.
51. Izawa I, Tamaki N, Saya H. Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 1996;382(1-2):53-9.
52. Messiaen LM, Callens T, Roux KJ, et al. Exon 10b of the NF1 gene represents a mutational hotspot and harbors a recurrent missense mutation Y489C associated with aberrant splicing. *Genet Med.* 1999;1(6):248-53.
53. Harder A, Titze S, Herbst L, et al. Monozygotic twins with neurofibromatosis type 1 (NF1) display differences in methylation of NF1 gene promoter elements, 5' untranslated region, exon and intron 1. *Twin Res Hum Genet.* 2010;13(6):582-94.
54. Upadhyaya M, Huson SM, Davies M, et al. 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. *Am J Hum Genet.* 2007;80(1):140-51.

55. De Raedt T, Brems H, Lopez-Correa C, Vermeesch JR, Marynen P, Legius E. Genomic organization and evolution of the NF1 microdeletion region. *Genomics*. 2004;84(2):346-60.
56. Lopez Correa C, Brems H, Lazaro C, Marynen P, Legius E. Unequal meiotic crossover: a frequent cause of NF1 microdeletions. *Am J Hum Genet*. 2000;66(6):1969-74.
57. Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, et al. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Hum Genet*. 1998;102(5):591-7.
58. Kehrer-Sawatzki H, Kluwe L, Sandig C, et al. High frequency of mosaicism among patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) with microdeletions caused by somatic recombination of the JAZ1 gene. *Am J Hum Genet*. 2004;75(3):410-23.
59. Venturin M, Guarnieri P, Natacci F, et al. Mental retardation and cardiovascular malformations in NF1 microdeleted patients point to candidate genes in 17q11.2. *J Med Genet*. 2004;41(1):35-41.
60. Venturin M, Bentivegna A, Moroni R, Larizza L, Riva P. Evidence by expression analysis of candidate genes for congenital heart defects in the NF1 microdeletion interval. *Ann Hum Genet*. 2005;69(Pt 5):508-16.
61. Wimmer K, Yao S, Claes K, et al. Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(3):265-76.
62. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*. 2005;1(6):e49.
63. De Raedt T. Somatic NF1 Mutations in Tumors and Other Tissues. Kaufmann(ed): *Neurofibromatoses, Monogr Hum Genet*, Basel, Karger. Volume 16, 2008:43-53.
64. Kehrer-Sawatzki H. Structure of the NF1 gene region and mechanism underlying gross NF1 deletions. Kaufmann(ed): *Neurofibromatoses, Monogr Hum Genet*, Basel, Karger. Volume 16, 2008:89-102.
65. Serra E, Rosenbaum T, Winner U, et al. Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. *Hum Mol Genet*. 2000;9(20):3055-64.
66. Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science*. 2002;296(5569):920-2.
67. Mensink KA, Ketterling RP, Flynn HC, et al. Connective tissue dysplasia in five new patients with NF1 microdeletions: further expansion of phenotype and review of the literature. *J Med Genet*. 2006;43(2):e8.
68. Morse RP. Neurofibromatosis type 1. *Arch Neurol*. 1999;56(3):364-5.
69. De Raedt T. Somatic NF1 Mutations in Tumors and Other Tissues. Kaufmann(ed): *Neurofibromatoses, Monogr Hum Genet*, Basel, Karger. 2008;16:143-53.
70. Petrak B, Plevová P, Novotný J, Foretová L. Neurofibromatosis von Recklinghausen. *Klin Onkol*. 2009;22(Suppl):38-44.
71. Lee AG. Neuroophthalmological management of optic pathway gliomas. *Neurosurg Focus*. 2007;23(5):E1.
72. Wojtkowiak JW, Fouad F, LaLonde DT, et al. Induction of apoptosis in neurofibromatosis type 1 malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines by a

- combination of novel farnesyl transferase inhibitors and lovastatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;326(1):1-11.
73. Ambrosini G, Cheema HS, Seelman S, et al. Sorafenib inhibits growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(4):890-6.
 74. Johansson G, Mahller YY, Collins MH, et al. Effective in vivo targeting of the mammalian target of rapamycin pathway in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(5):1237-45.
 75. Cui Y, Costa RM, Murphy GG, et al. Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning. *Cell.* 2008;135(3):549-60.
 76. Lazaro C, Gaona A, Xu G, Weiss R, Estivill X. A highly informative CA/GT repeat polymorphism in intron 38 of the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Genet.* 1993;92(4):429-30.
 77. Lazaro C, Gaona A, Estivill X. Two CA/GT repeat polymorphisms in intron 27 of the human neurofibromatosis (NF1) gene. *Hum Genet.* 1994;93(3):351-2.
 78. Han SS, Cooper DN, Upadhyaya MN. Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Genet.* 2001;109(5):487-97.
 79. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3894-900.
 80. Bottillo I, Ahlquist T, Brekke H, et al. Germline and somatic NF1 mutations in sporadic and NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol.* 2009;217(5):693-701.
 81. De Luca A, Schirinzi A, Buccino A, et al. Novel and recurrent mutations in the NF1 gene in Italian patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mutat.* 2004;23(6):629.
 82. Poyhonen M, Kytola S, Leisti J. Epidemiology of neurofibromatosis type 1 (NF1) in northern Finland. *J Med Genet.* 2000;37(8):632-6.
 83. Delis KT, Gloviczki P. Middle aortic syndrome: from presentation to contemporary open surgical and endovascular treatment. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.* 2005;17(3):187-203.
 84. Kosztolanyi G. Does "ring syndrome" exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet.* 1987;75(2):174-9.
 85. Tsilchorozidou T, Menko FH, Lalloo F, et al. Constitutional rearrangements of chromosome 22 as a cause of neurofibromatosis 2. *J Med Genet.* 2004;41(7):529-34.
 86. Toriello HV, Meck JM. Statement on guidance for genetic counseling in advanced paternal age. *Genet Med.* 2008;10(6):457-60.
 87. Nybo Andersen AM, Hansen KD, Andersen PK, Davey Smith G. Advanced paternal age and risk of fetal death: a cohort study. *Am J Epidemiol.* 2004;160(12):1214-22.
 88. Riccardi VM. Neurofibromatosis heterogeneity. *J Am Acad Dermatol.* 1984;10(3):518-9.
 89. Jadayel D, Fain P, Upadhyaya M, et al. Paternal origin of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Nature.* 1990;343(6258):558-9.
 90. Crow JF. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet.* 2000;1(1):40-7.
 91. Ferner RE, Huson SM, Thomas N, et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 2007;44(2):81-8.

92. Bendova S, Krepelova A, Petrak B, et al. Novel mutations in the NF1 gene in Czech patients with neurofibromatosis type 1. *J Mol Neurosci.* 2007;31(3):273-9.
93. De Luca A, Buccino A, Gianni D, et al. NF1 gene analysis based on DHPLC. *Hum Mutat.* 2003;21(2):171-2.
94. Messiaen LM, Callens T, Mortier G, et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat.* 2000;15(6):541-55.
95. Valero MC, Martin Y, Hernandez-Imaz E, et al. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn.* 2011;13(2):113-22.
96. Harder A, Rosche M, Reuss DE, et al. Methylation analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) promoter in peripheral nerve sheath tumours. *Eur J Cancer.* 2004;40(18):2820-8.
97. Fishbein L, Eady B, Sanek N, Muir D, Wallace MR. Analysis of somatic NF1 promoter methylation in plexiform neurofibromas and Schwann cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;157(2):181-6.
98. Wimmer K, Roca X, Beiglbock H, et al. Extensive in silico analysis of NF1 splicing defects uncovers determinants for splicing outcome upon 5' splice-site disruption. *Hum Mutat.* 2007;28(6):599-612.
99. Messiaen L. *Mutational Spectrum.* Kaufmann(ed): Neurofibromatoses, Monogr Hum Genet, Basel, Karger. 2008;16:63-7.

6 Seznam příloh – vlastní publikace k tématu práce

Publikace 1

Bendova S, Krepelova A, Petrak B, Kinstova L, Musova Z, Rausova E, Marikova T.
Novel mutations in the NF1 gene in Czech patients with neurofibromatosis type 1.
J Mol Neurosci. 2007; 31(3): 273-9.

Publikace 2

Petrak B, Bendova S, Seeman T, Klein T, Lisy J, Zatrapa T, Marikova T. **Mid-aortic syndrome with renovascular hypertension and multisystem involvement in a girl with familiar neurofibromatosis von Recklinghausen type 1.** Neuro Endocrinol Lett. 2007; 28(6): 734-8.

Publikace 3

Havlovicova M, Novotna D, Kocarek E, Novotna K, Bendova S, Petrak B, Hrdlicka M, Sedlacek Z. **A girl with neurofibromatosis type 1, atypical autism and mosaic ring chromosome 17.** Am J Med Genet A. 2007; 143(1): 76-81.

Publikace 4

Snajderova M, Riccardi V. M, Petrak B, Zemkova D, Zapletalova J, Mardesic T, Petrakova A, Lanska V, Marikova T, Bendova S, Havlovicova M, Kaluzova M. **The Importance of Advanced Paternal Age in the Origin of Neurofibromatosis Type 1.** Am J Med Genet A. 2012 Epub ahead of print

Publikace 5

Kalužová M, Petrák B, Lisý J, Vaculík M, Bendová Š.
Idiopatická stenosa akveduktu a porucha vývoje řeči u dětí s neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1. Připravovaný rukopis

Publikace 6

Bendova S, Vasovcak P, Sedlacek Z, Marikova T, Kaluzova M, Petrak B, Krepelova A.
RNA-based mutational analysis of Czech patients suspected of NF1 as an efficient alternative for less sensitive DHPLC pre-screening. Připravovaný rukopis

Novel Mutations in the NF1 Gene in Czech Patients With Neurofibromatosis Type 1

Sarka Bendova,^{*1} Anna Krepelova,¹ Borivoj Petrak,² Lenka Kinstova,²
Zuzana Musova,¹ Eva Rausova,¹ and Tatana Marikova¹

¹Institute of Biology and Medical Genetics, University Hospital Motol and 2nd School of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; and ²Department of Child Neurology, University Hospital Motol and 2nd School of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received September 13, 2006; Accepted September 25, 2006

Abstract

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is one of the most common inherited human disorders, with an estimated incidence of 1 per 3500 births. In most cases, the disease is caused either by mutation in the *NF1* gene, or by a particular or complete deletion of the *NF1* gene. The *NF1* gene exhibits one of the highest mutation rates of any human disorder. In this experimental study of the *NF1* gene, we screened the mutational spectrum of 22 unrelated patients from the Czech Republic using the denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) methods. We found *NF1* mutations in 17 patients: 15 causal mutations were detected with the use of the DHPLC method (15/20, 75%). With the MPLA method, we also confirmed and specified two large deletions that were previously genotyped by microsatellite markers. Twelve of the above-mentioned mutations were newly found: c.1_2delATinsCC, c.1185+1G>C, c.1757_1760delCTAG, c.1642-7A>G, c.2329 T>G, c.2816delA, c.3738_3741delGTTT, c.4733 C>T, c.5220delT, c.6473_6474insGAAG, ex14_49del, ex28_49del. We present this study as a first effectual step in the routine diagnosis of the *NF1* in patients from the Czech Republic.

DOI 10.1385/JMN/31:03:273

Index Entries: Neurofibromatosis type 1; *NF1*; DHPLC; MLPA; mutation detection.

Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1; MIM# 162200) is one of the most common autosomal dominant disorders with an incidence of 1 per 3500 births. NF1 is caused by defects in the *NF1* gene on chromosome 17q11.2, which consists of 60 exons and encodes a GTPase activating protein (GAP), neurofibromin. Two functional regions of neurofibromin have been identified, a central GAP related domain (GRD) encoded by exons 20–27 (Ahmadian, 2003; Scheffzek K, 1998) and several cAMP-dependent protein-kinase

recognition sites encoded by exons 11–17 (Mattocks, 2004). To date, more than 800 different *NF1* mutations have been identified and registered in the Human Gene Mutation Database (HGMD). The *NF1* gene exhibits one of the highest mutation rates of any human hereditary. A genotype–phenotype correlation analysis suggests that there is no clear relationship between specific *NF1* mutations and the clinical features of the patients suffering from the disease. The cardinal features of the disease are café-au-lait (CAL) spots, neurofibromas, freckling of the axillary or inguinal regions, Lisch nodules, optic nerve

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed. E-mail: sarka.bendova@lfmotol.cuni.cz

glioma, and bone dysplasias (NIH, 1998). The clinical symptomatology includes many systems with symptomatology dermatological, neurological, and ophthalmological, also with typical osteological and vascular changes (Gutmann, 1997).

In this paper, we describe our current experimental study of the *NF1* gene analysis performed 22 unrelated patients from the Czech Republic and describe our results.

Patients and Methods

We investigated 22 unrelated patients from the Czech Republic (15 females and 7 males) who had NF1 within this study. The NF1 diagnosis was confirmed according to the National Institutes of Health (NIH) criteria identified at the NIH Consensus Development Conference in 1988 (NIH, 1998). All the patients subscribed to the study and gave their informed consent. The clinical data relating to the mutations of carriers that was collected is summarized in Table 1. Genomic DNA was extracted using standard procedures from peripheral blood leucocytes.

PCR

Genomic DNA was amplified in 60 PCR fragments (172–517 bp) corresponding to 60 exons of the *NF1* gene. All primers and the PCR reaction conditions were designed according to the process of (Han, 2001). The PCR cycling regime consisted of an initial denaturation step at 94°C for 60 s, followed by 33 cycles of denaturation at 94°C for 60 s, annealing at a specific temperature for each fragment for 60 s, extension at 72°C for 60 s, and a final extension step at 72°C for 7 min. All thermal cycles were run on an Applied Biosystems 2720 thermal cycler.

DHPLC

The denaturation and re-annealing step was required after the standard PCR amplification for heteroduplex formation to occur and so obtain improved DHPLC analysis. Samples were denatured at 95°C for 5 min and then allowed to reanneal at room temperature over 30 min (Kuklin, 1997). DHPLC was performed on a WAVE DNA fragment analysis system by using a DNASep column and commercially available WAVE Optimized™ Buffers and Syringe Solution were used (provided by Transgenomic, UK). The PCR products were separated through a 5% linear acetonitrile gradient (using buffers A, B, C, D, at a flow rate 0.90 mL/min). Temperatures for optimal heteroduplex separation and the melting

domains for DHPLC were designed according to Han, 2001 and checked using the WAVEMAKER Software version 4.1. Twenty NF1 patients were screened in 60 exons and splice sites of the *NF1* gene by DHPLC analysis. Each of amplicons comprised exon and marginal intronic splice sites. Abnormal elution patterns were identified in many cases (Tables 2 and 3) (Fig. 1).

Sequencing

All of the PCR fragments displaying abnormal elution patterns were re-amplified, purified, and directly sequenced in both directions using standard procedures. The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and the ABI 3100 Avant Genetic Analyser were used (available from Applied Biosystems). Forward and reverse sequences were compared with the reference sequence (Gene Bank accession no. AY796305). All detected mutations were verified by repeat a PCR re-amplification and sequencing in both directions. Relatives of the patients who met NIH criteria were investigated only by sequencing of the mutant exons.

MLPA

The MLPA analysis detects whole-exon deletions or duplications (Schouten, 2002). MLPA analysis was carried out using the standard SALSA MLPA KIT P081/P082 for all applications and for the MLPA protocol (MRC-Holland). The MLPA PCR products were analyzed in the ABI PRISM Avant 3100 genetic analyser and the data was analyzed using the Genemapper software. All 22 patients were screened by this method. With this analysis of the patient's data, two families were genotyped by using microsatellite markers located in intron 27 (IVS27AC28.4A, IVS27AC28.4B, IVS27TG24.8A, IVS27TG24.8B) (Lazaro, 1994) and in intron 38 (53.0A, 53.0B) (Lazaro, 1993). In these cases MLPA analysis was used for results specification. The *NF1* gene mutation analysis of these two families was not comprised of DHPLC analysis and sequencing methods.

Results

In this study, 22 unrelated NF1 families were investigated for *NF1* mutations by a combination of methods including DHPLC, MLPA, and direct sequencing.

Description of Mutations

In total, we identified, by applying the DHPLC method, 15 causal mutations comprising 5 frameshift

Table 1
Summary of Clinical Data Carriers of *NF1* Mutations

Patient No.	Age	1st sy/age	GR	Delayed		CAL	Nf	Tu	CNS	Seizures	HC	LN	OD	Other sy	Positive fam. history
				PMD	GR										
1a	17	CAL/neo	+	+	+	+	+	H	-	-	+	+	+	Manio-depressive psychosis	Father, his mother
1b	46	CAL/child	-	-	+	+	+	G	-	-	+	-	-	-	Son
2a	26	CAL/neo	-	+	+	+	+	H	+	-	+	-	-	-	Father, his mother
2b	56	CAL/child	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	HT	Son, mother
3a	8	CAL/neo	-	+	+	+	+	H,G	-	-	+	-	-	Coarctation Ao, stenosis art. ren., mid-aortic syndrome	Father, his father
4a	14	CAL/neo	-	+	+	+	+	H,G	-	-	+	+	-	-	-
5a	26	CAL/neo	+	-	+	+	+	H	-	-	+	-	-	-	Father, sister
5b	24	CAL/neo	-	-	+	+	+	H	-	-	+	-	-	-	Father, brother
5c	54	CAL/10	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	Son, daughter
6a	16	CAL/neo	-	+	+	+	+	H	+	+	+	-	-	Dysfasie, HT	-
7a	23	CAL/neo	-	-	+	+	+	G,H	+	+	+	-	-	-	-
8a	14	CAL/infant	+	+	+	+	+	G,H	+	+	+	-	-	-	-
9a	27	CAL/infant	-	-	+	+	+	G	-	-	?	-	-	-	Father, his mother
10a	33	CAL/child	-	-	+	+	+	-	-	-	?	-	-	-	Children
10b	7	CAL/child	-	-	+	+	+	-	-	-	?	+	-	-	Mother, sister
10c	12	CAL/child	-	-	+	+	+	-	-	-	?	-	-	-	Mother, sister
11a	18	HT/12	-	-	+	+	+	G bilat.	-	-	+	-	-	-	Mother
11b	44	CAL/child	-	-	+	+	+	-	-	-	?	-	-	-	Mother
12a	26	CAL/neo	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	Mother
12b	48	CAL/child	-	-	+	+	+	?	-	-	-	-	-	-	Son
13	3	CAL/infant	-	-	+	+	+	H,G	-	-	-	-	-	-	-
14	15	CAL/neo	+	+	+	+	+	H,G	-	-	-	-	-	-	-
15	5	CAL/neo	-	-	+	+	+	H,G	-	-	-	-	-	-	-
16	5	CAL/child	-	-	+	+	+	H	-	-	-	-	-	-	-
17a			+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	Sister died under Noonan syndrome, mother?

CAL, Café-au-lait spots; GR, growth retardation; Nf, neurofibromas; LN, lisch's nodules; H, hamarthomas; G, gliomas; HC, hydrocephalus; HT, hypertension; OD, osseous dysplasia; VSD, ventricular septal defect.

Table 2
Summary of Mutations Detected in the *NF1* Gene

Fragment	No. patient	Genomic mutation	Aminoacid mutation	Type	Method	References
exon 1	5a,b,c	c.1_2delATinsCC	p.Met1?	Indels	DHPLC	This report
exon 4b	4a	c.499_502delTGTT	p.Cys167Gln fsX10	Deletion, frameshift	DHPLC	Lee, 2006
exon 4b	9a	c.528 T>A	p.Glu176Asp	Missense, unknown impact	DHPLC	This report
exon 4c	8a	c.647 T>C	p.Leu216Pro	Missense	DHPLC	Fahsold, 2002
intron 8	16	c.1185+1G>C		Splice site	DHPLC	This report
intron 10c	1a,b	c.1642-2A>G		Splice site	DHPLC	Ars, 2003
intron 10c	17a,b	c.1642-7A>G		Splice site	DHPLC	This report
exon 12a	14	c.1757_1760delCTAG	p.Thr586Ile fsX18	Deletion, frameshift	DHPLC	This report
exon 12a	13	c.1748 A>G	p.Lys583Arg	Missense	DHPLC	Fahsold, 2000
exon 15	7a	c.2329 T>G	p.Trp777Ser	Missense	DHPLC	This report
exon 16	9a	c.2816delA	p.Asn936Ile fsX15	Deletion, frameshift	DHPLC	This report
exon 22	10a,b,c	c.3738_3741delGTTT	p.Phe1247Ile fsX18	Deletion, frameshift	DHPLC	This report
exon 27b	15	c.4733 C>T	p.Ser1578Phe	Missense	DHPLC	This report
exon 29	6a	c.5220delT	p.Val1740Ser fsX3	Deletion, frameshift	DHPLC	This report
exon 34	3a	c.6473_6474ins GAAG	p.Ser2159Lys fsX15	Insertion, frameshift	DHPLC	This report
exon 45	12a,b	c.7846 C>T	p.Arg2616X	Nonsense	DHPLC	Upadhyaya, 1995
exon 14–49	2a,b	ex14_49del	skipping exons 14–49	Deletion	MLPA	This report
exon 28–49	11a,b	ex28_49del	skipping exons 28–49	Deletion	MLPA	This report

DHPLC, denaturing high-performance liquid chromatography; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification.

Table 3
Summary of Mutations Detected in the *NF1* Gene—Not Segregated With Diseases

Fragment	Pac. no.	Genomic mutation	Aminoacid mutation	Type	Method
exon 6	1a	c.847 G>A	p.Gln282Gln	Silent	DHPLC
exon 10b	14a	c.1458 A>C	p.Thr486Thr	Silent	DHPLC

DHPLC, denaturing high-performance liquid chromatography; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification.

deletions, 1 insertion, 1 indel mutation, 3 splice site mutations, 4 missense mutations, and 1 nonsense mutation. We identified through the analysis that, 15 pathogenic mutations were found, 5 of which were previously reported, and the remaining 10 mutations were found to represent novel pathogenic mutations. It was also identified that two silent mutations did not segregate with disease and that one missense mutation with unknown impact occurred (Tables 2 and 3). Any recurrent mutations were found.

Using the MLPA method two large genomic rearrangements were confirmed and found to be

novel (Table 2) (Figs. 2 and 3). All the detected polymorphisms were reported previously in the Gene Bank.

Discussion

The mutation detection rate of 75% (15/20), which was determined by using the DHPLC method in this experimental study, is comparable with most previous studies (Fahsold, 2000; Han, 2001; Kluwe, 2003; De Luca, 2004). This result might have been biased by a number of factors including: the small group size, the fact that only small, marginal intronic parts

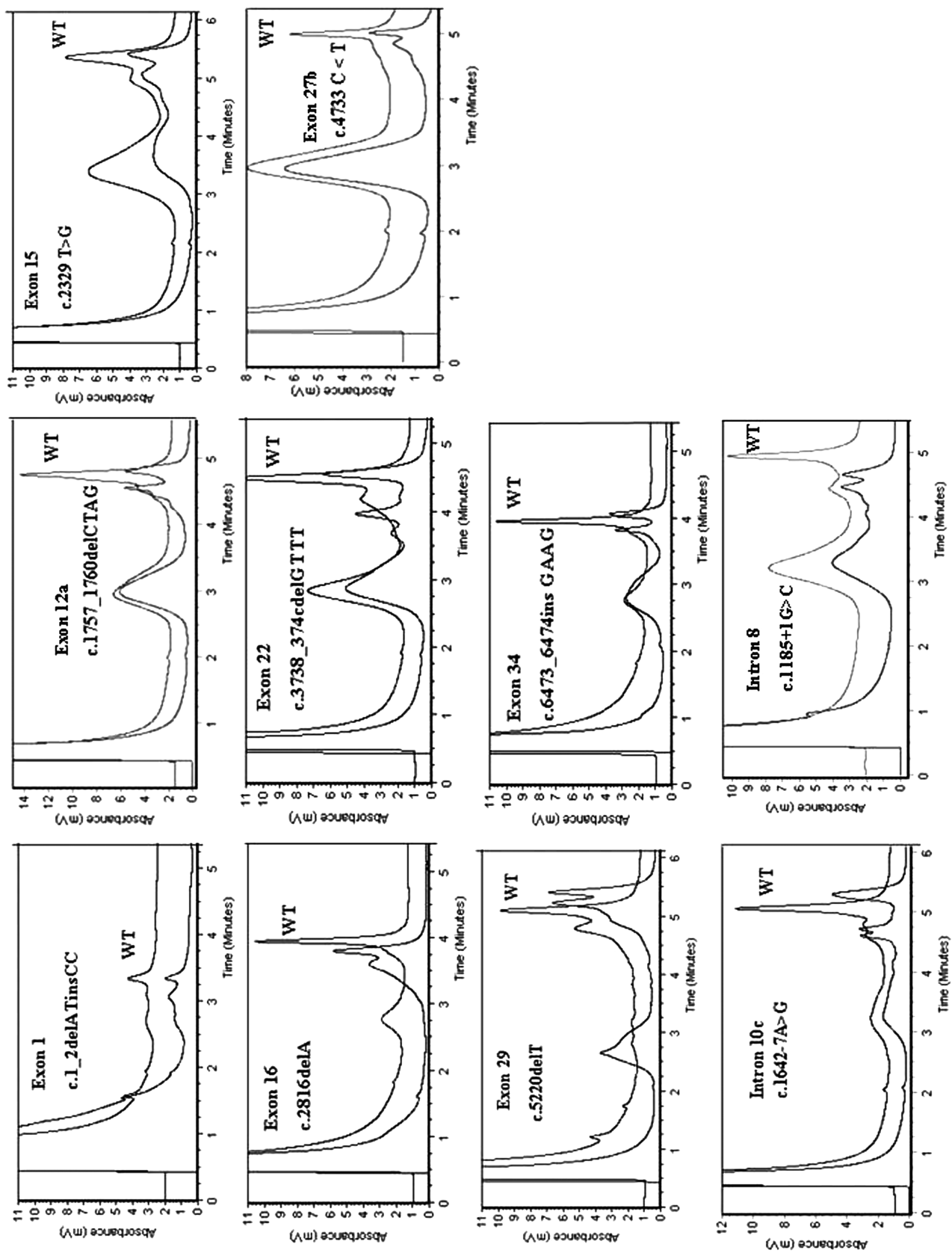


Fig. 1. Denaturing high-performance liquid chromatograms for novel pathogenic *NF1* mutation (wild-type vs mutation). All of these mutations were detected as change in the number of peaks.

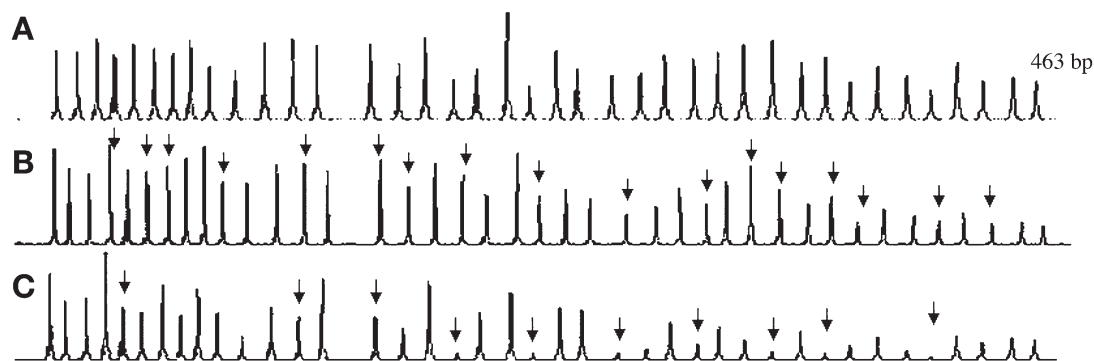


Fig. 2. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)—Salsa MLPA P081 NF1 probemix. **A**, control; **B**, Patient 2a; **C**, Patient 11a (for the mutations, see Table 2 and for Salsa MLPA P081 NF1 probemix details, see <http://www.mrc-holland.com>).

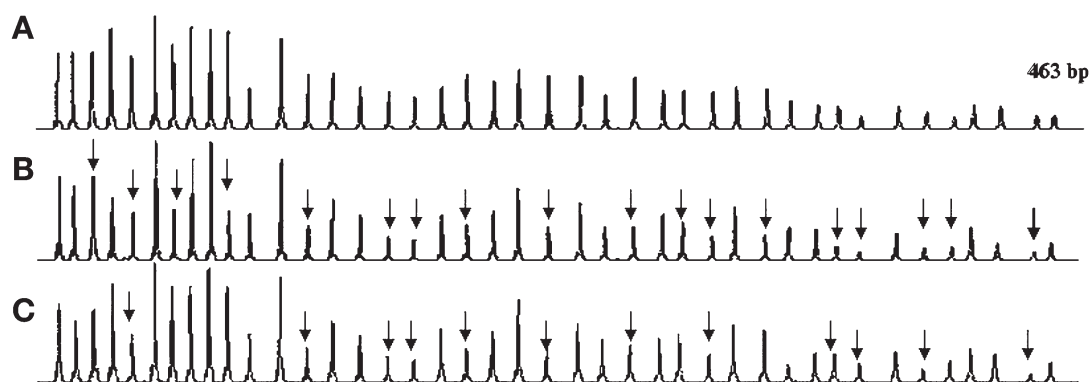


Fig. 3. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) chromatographs—Salsa MLPA P082 NF1 probemix. **A**, control; **B**, Patient 2a; **C**, Patient 11a (for mutations, see Table 2, and for Salsa MLPA P082 NF1 probemix details, see <http://www.mrc-holland.com>).

of *NF1* gene were screened, and the fact that the DHPLC technique is not 100% sensitive.

Patient Number 9a (Tables 1 and 2) is a carrier of two *NF1* mutations in the *cis*-type position. Mutation (c.2816delA, p.Asn936Ile fsX15) is clearly pathogenic, but the other one (c.528 T>A, p.Glu176Asp) is a missense mutation with unknown impact. Any of these mutations has been reported yet elsewhere. Patients 13a and 13b (Tables 1 and 2) carry the mutation in the splice site of the intron 10c (c.1642-7A>G). In this position, this type of mutation has not been previously described in the literature but the splice site mutation was reported by Side (1997) in the next nucleotide.

For detections of large duplications or inversions, the MLPA method was used. Any genomic rearrangements were found by using this method separately. Genomic rearrangements represent only approx 2%

of all *NF1* mutations (Wimmer, 2006). With respect to the group size, the probability of detection would be very low. The MLPA method confirmed this hypothesis and specified that two large deletions were genotyped by microsatellite markers previously.

In this experimental study, we did not observe any clear correlation between *NF1* mutations and distinct clinical features. *NF1* is known by a highly variable expression even within families (Tonsgard, 2006). For our investigation (see Table 1), the carriers of the *NF1* mutations have shown a very wide spectrum of distinct clinical features (Table 1, in particular patients 5a–c).

In conclusion, we have performed molecular diagnosis of the *NF1* gene by using the DHPLC method to screen the whole coding region with marginal splice sites and by using the MLPA method to detect exons that change. We present this experimental study as

a first effectual step in the routine diagnosis procedure for patients NF1 from the Czech Republic.

Acknowledgments

This research was financially supported by grants IGA MZ CR NR 7926-3 and AV-CR-1ET 101210513.

References

- Ahmadian M. R., Kiel C., Stege P., and Scheffzek K. (2003) Structural fingerprints of the Ras-GTPase activating proteins neurofibromin and p120GAP. *J. Mol. Biol.* **329**, 699–710.
- Ars E., Kruyer H., Morell M., et al. (2003) Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. *J. Med. Genet.* **40**, e82.
- De Luca A., Schirinzi A., Buccino A., et al. (2004) Novel and recurrent mutations in the NF1 gene in Italian patients with neurofibromatosis type 1. *Hum. Mutat.* **23**, 629.
- Donohoe E. (2005) Denaturing high-performance liquid chromatography using the WAVE DNA fragment analysis system. *Methods Mol. Med.* **108**, 173–187.
- Fahsold R., Hoffmeyer S., Mischung C., et al. (2000) Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 790–818.
- Gutmann D. H., Aylsworth A., Carey J. C., et al. (1997) The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* **278**, 51–57.
- Han S. S., Cooper D. N., and Upadhyaya M. N. (2001) Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Genet.* **109**, 487–497.
- Jeong S. Y., Park S. J., and Kim H. J. (2006) The spectrum of NF1 mutations in Korean patients with neurofibromatosis type 1. *J. Korean Med. Sci.* **21**, 107–112.
- Kluwe L., Friedrich R. E., Peiper M., Friedman J., and Mautner V.F. (2003) Constitutional NF1 mutations in neurofibromatosis 1 patients with malignant peripheral nerve sheath tumors. *Hum. Mutat.* **22**, 420.
- Kuklin A., Munson K., Gjerde D., Haefele R., and Taylor P. (1997) Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system. *Genet. Test.* **1**, 201–206.
- Lazaro C., Gaona A., Xu G., Weiss R., and Estivill X. (1993) A highly informative CA/GT repeat polymorphism in intron 38 of the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum. Genet.* **92**, 429–430.
- Lazaro C., Gaona A., and Estivill X. (1994) Two CA/GT repeat polymorphisms in intron 27 of the human neurofibromatosis (NF1) gene. *Hum. Genet.* **93**, 351–352.
- Lee M. J., Su Y. N., You H. L., et al. (2006) Identification of forty-five novel and twenty-three known NF1 mutations in Chinese patients with neurofibromatosis type 1. *Hum. Mutat.* **27**, 832.
- Mattocks C., Baralle D., Tarpey P., French-Constant C., Bobrow M., and Whittaker J. (2004) Automated comparative sequence analysis identifies mutations in 89% of NF1 patients and confirms a mutation cluster in exons 11–17 distinct from the GAP related domain. *J. Med. Genet.* **41**, e48.
- Scheffzek K., Ahmadian M. R., Wiesmuller L., et al. (1998) Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *EMBO J.* **17**, 4313–4327.
- Schouten J. P., McElgunn C. J., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., and Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **30**, e57.
- Side L., Taylor B., Cayouette M., et al. (1997) Homozygous inactivation of the NF1 gene in bone marrow cells from children with neurofibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1713–1720.
- Tonsgard J. H. (2006) Clinical manifestations and management of neurofibromatosis type 1. *Semin. Pediatr. Neurol.* **13**, 2–7.
- Upadhyaya M., Maynard J., Osborn M., et al. (1995) Characterisation of germline mutations in the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *J. Med. Genet.* **32**, 706–710.
- Wimmer K., Yao S., Claes K., et al. (2006) Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes Chromosomes Cancer* **45**, 265–276.
- (1988) Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch. Neurol.* **45**, 575–578.

Mid-aortic syndrome with renovascular hypertension and multisystem involvement in a girl with familial neurofibromatosis von Recklinghausen type 1

Borivoj PETRAK¹, Sarka BENDOVA², Tomas SEEMAN³, Tibor KLEIN⁴, Jiri LISY⁵, Tomas ZATRAPA¹ and Tana MARIKOVA²

1. Department of Child Neurology, Charles University, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic
2. Institute of Biology and Human Genetics, Charles University, 2nd Medical School, Prague, Czech Republic
3. Department of Paediatrics, Charles University, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic
4. Cardiocenter, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic
5. Department of Radiology, Charles University, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Correspondence to: Borivoj Petrak, MD., CSc.
Department of Child Neurology,
2nd Medical School, Charles University, University Hospital Motol
V Uvalu 84, 150 06 Prague 5, Czech Republic
PHONE: +420 2 24433301
FAX: +420 2 24433322
EMAIL: borivoj.petrak@post.cz

Submitted: August 1, 2007

Accepted: September 8, 2007

Key words: **neurofibromatosis type 1; NF1 gene; exon 34; mid-aortic syndrome; renovascular hypertension; optic glioma; pubertas praecox; mental retardation**

Neuroendocrinol Lett 2007;28(6):734–738 PMID: 18063929 NEL280607C03 ©2007 Neuroendocrinology Letters • www.nel.edu

Abstract

OBJECTIVES: Neurofibromatosis von Recklinghausen type 1 (NF1) is an autosomal dominant neurocutaneous disorder affecting one in 3 000–4 000 individuals. Mid-aortic syndrome (MAS) is a rare condition characterized by segmental narrowing of abdominal aorta and stenosis of its major branches – mainly renal arteries, including manifestation of renovascular hypertension. MAS can be caused by different diseases, including NF1. **MAIN FINDINGS:** A 9 years old girl with primary diagnosis of NF1 combined with renovascular hypertension due to MAS, suffered of bilateral optic and chiasm glioma, pubertas praecox, speech disorder, light mental retardation and scoliosis. We have found a mutation in exon 34 of the NF1 gene (17q11.2). Her father has been also diagnosed with NF1 and hypertension developed at early age. He has the same mutation in exon 34 of NF1 gene. The girl is currently treated with conservative antihypertensive medication with positive effect. Bilateral optic and chiasm glioma are asymptomatic at the time and they had been without progress over period of time. Any vascular surgery, neurosurgical and oncological therapy are not indicated at the present time. **CONCLUSION:** This article is a summary of clinical findings in patient with NF1 due to NF1 gene mutation in exon 34. It confirms the importance of complex multidisciplinary approach to examination and taking care of NF1 patients and their families.

Abbreviations

NF1	- Neurofibromatosis von Recklinghausen type 1
T2-TSE	- T2-weighted turbo spin echo
T2- TSE.F/S	- T2- weighted turbo spin echo/fat saturation image)
MAS	- Mid-aortic syndrome
FASI	- Hypersignal foci in T2-weighted images
DHPLC	- Denaturing high performance liquid chromatography
DNA	- Deoxyribonucleic acid
PCR	- Polymerase chain reaction
MLPA	- Multiplex ligation-dependent probe amplification
MAG3	- Mercaptoacetyltriglycine
BP	- Blood pressure
MRI	- Magnetic resonance imaging
FLAIR	- Fluid attenuated inversion recovery
EEG	- Electroencephalography
ECHO	- Echocardiography

INTRODUCTION

The incidence of hypertension in children is reported (in the US) to be 1–5%. Renovascular disease is a frequent cause of severe arterial hypertension in childhood. The most common cause of renovascular hypertension in children is fibromuscular dysplasia involving the renal arteries (Bartosh & Aronson, 1999). About 15% of these cases are associated with neurofibromatosis von Recklinghausen type 1 (NF1). Arterial hypertension in paediatric patients with NF1 is usually due to renal artery stenosis (Estepa *et al.*, 2001). A rare condition in children with renovascular hypertension is the mid-aortic syndrome (MAS) characterized by segmental stenosis of proximal abdominal aorta or distal descendent abdominal aorta combined with stenoses of its main branches – mainly renal arteries (Delis & Gloviczki, 2005). MAS can be acquired, caused by some conditions, including NF1, or congenital (Criado *et al.*, 2002).

NF1 is an autosomal dominant disorder affecting one in 3000–4000 individuals; 40–50% of all cases are sporadic. Symptoms are highly variable. Diagnostic criteria for NF1 includes café au lait spots, axillary and/or inguinally freckling, neurofibromas and/or plexiform neurofibromas, Lisch nodules, optic glioma, distinct osseous lesions and first-degree relative with NF1. To make diagnose of NF1, it is necessary to fulfil at least two diagnostic criteria (Goldstein & Gutmann, 2004).

NF1 is caused by mutations of the gene on chromosome 17q11.2. This tumor suppressor gene encodes neurofibromin. Neoplastic processes are usually hamartomas or low grade tumours, however malignant transformation is also described (Goldstein & Gutmann, 2004). The most common tumours associated with NF1 are neurofibromas and optic gliomas (pilocytic astrocytoma grade I). Optic gliomas in NF1 occur in many (2/3) asymptomatic cases, only long-term surveillance is recommended (Listernick *et al.*, 1999).

MRI of the brain also reveals multilocular hypersignal foci in T2-weighted images (FASI) localized in basal ganglia, brain stem and cerebellar white matter. These foci were present in 43%–89% children with NF1 and have

non-neoplastic character. They appear to correspond with pathologic findings of areas of the myelin vacuolar change (Osborn & Salzman 2004, diPaolo *et al.*, 1995).

We have introduced reliable indirect and direct NF1 molecular genetic (DNA) analysis.

Direct DNA diagnostics of NF1 with purpose of detecting specific mutations and polymorphisms is being introduced at the present time. Genomic DNA was amplified in 60 PCR fragments corresponding to 60 exons of the NF1 gene. All primers, PCR reaction conditions, temperatures for optimal heteroduplex separation and the melting domains for DHPLC were designed (Han *et al.*, 2001). All detected mutations were verified by repeated PCR re-amplification and sequencing in both directions. Forward and reverse sequences were compared with the reference sequence. For detections of large duplications or inversions, the MLPA method was used. Genomic rearrangements represent only approximately 2% of all NF1 mutations (Wimmer *et al.*, 2006).

This article is a summary of clinical findings in patient with NF1 due to determined NF1 gene mutation.

CASE REPORT

The girl was born in 1998 from first physiological gravidity, birthweight 4090 g/birthlength 53 cm, normal adaptation. There was uneven mental and motoric development since approx. 4th month. She began to walk at 15th month of age. Speech development retardation was observed, she pronounced her first word when she was 18 month old; she has speech development disorder. Her intellectual abilities were evaluated significantly below average. Café au lait spots observed from approx. 6th month of age.

During a regular medical check-up at 3 years of age an elevated blood pressure (BP) was revealed (BP 150/90 mm Hg). Blood pressure on the legs was much lower then on the arms. Echocardiography (ECHO) revealed hypertrophy of the left ventricle and hypoplasia (stenosis) of the abdominal aorta. Stenosis of abdominal aorta and stenosis of both renal arteries corresponding to MAS was proved by angiography. Stenosis was located near truncus coeliacus with stricture up to 3.6 mm and 38 torr gradient. Below the stenosis the diameter is 4.7 mm (Figure 1). Stenosis involved the origin of the right renal artery (100/84 torr), on the left side stenoses on the middle part of the renal artery were noted. Dynamic renal scintigraphy with MAG3 without and after captopril revealed bilateral pathology with signs of significant stenosis of arteries supplying upper and middle part of left kidney. Her plasma creatinine level and estimated glomerular filtration rate were normal. Basal plasma renin activity in supine position was 3.596 µg/l/hr. (normal range 0.5–1.5), stimulated level was 15.064 µg/l/hr. (normal 0.7–2.6) and basal aldosteron level was 738 ng/l (normal 25–130). She had mild proteinuria and normal level of vanilmandelic acid in her urine. Her hypertension was controlled by quadruple antihypertensive medication (atenolol, amlo-

dipine, prazosin and minoxidil). BP gradually decreased (110–120/60–75 mm Hg). Similar results were obtained during ambulatory 24-hr BP monitoring at daytime.

She had no headache or abdominal pain and her renal function was normal during this therapy. Surgical treatment such as bypass between thoracic and abdominal aorta and bypass of right renal artery has been considered, however it hasn't been performed yet due to satisfactory results of antihypertensive therapy.

The girl has positive family history. Her father had been diagnosed, according to dermal findings, with NF1 when he was 20 years old and he developed hypertension when he was 35. Our patient has no siblings.

During initial hospitalization (in 2001) the girl had been diagnosed as NF1 patient. NF1 diagnosis was confirmed by MRI examination of the brain, which showed gliomas of both optic nerves and optic chiasm (Figure 2). Multiple FASI on T2-weighted turbo spin echo (T2-TSE) and fluid attenuation inversion recovery (FLAIR) images in characteristic localisation in white matter of temporal lobes, basal ganglia and thalamus bilaterally, pons and white matter of cerebellum were observed (Figure 3).

During the last neurological examination a light mental retardation, speech development disorder, central hypotonic syndrome, dysmorphic facial traits, macrocephaly, scoliosis and abnormal shape of thorax were noted. She had skin picture characteristic for NF1 – multiple café au lait spots, axillary and inguinally freckling and probably plexiform neurofibromas.

Follow up MRI of brain at the end of 2005 showed no significant progress of the pathological changes, including gliomas of optic nerves and chiasm. Gliomas

are asymptomatic. Slight papillary atrophy on the eye-ground is probably consequence of I. grade hypertensive retinal angiopathy. The girl is also under surveillance of oncologist because of gliomas, but no oncotherapy and no neurosurgical treatment have been indicated. She has signs of the pubertas praecox. Ophthalmologic examination revealed iridial hamartomas – Lisch nodules.

Evoked potentials showed abnormal findings on electroretinography, normal response latency on visual evoked potentials and abnormal finding on brainstem auditory evoked potentials. There are no epileptiform graphoelements on EEG, sleep EEG is without pathology.

The girl and her family underwent genetic examination. Direct molecular genetic analysis of NF1 with purpose of detecting specific mutations and polymorphisms was used. We used the PCR, DHPLC and MLPA methods. In our patient a mutation in exon 34 (c.6473_6474insGAAG), was detected. The mutation c.6473_6474insGAAG causes translation of the mRNA to stop prematurely and a truncated protein to be produced (Figure 4). The same mutation in exon 34 of NF1 gene was found in her father.

DISCUSSION

A very rare reason of secondary arterial hypertension in NF1 is the MAS (Criado *et al.*, 2002). Our patient has characteristic signs of MAS, confirmed by angiography, ultrasonography and scintigraphy.

Renovascular hypertension is now controlled by antihypertensive medication, therefore surgical treatment was not necessary. However, this conservative therapy is



Figure 1. Stenosis of abdominal aorta is located near truncus coeliacus with stricture up to 3.6 mm. This narrow hypoplastic part is approximately 60 mm long (black arrow). Stenosis involvement of origin of the right renal artery, on the left side stenosis on the middle part (mid-portion) of the renal artery was noted (white arrows).

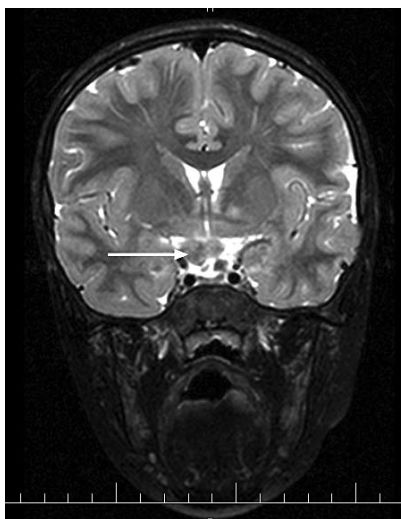


Figure 2. Glioma of optic chiasm (white arrow), coronal T2-TSE.F/S (T2-weighted turbo spin echo/fat saturation image).

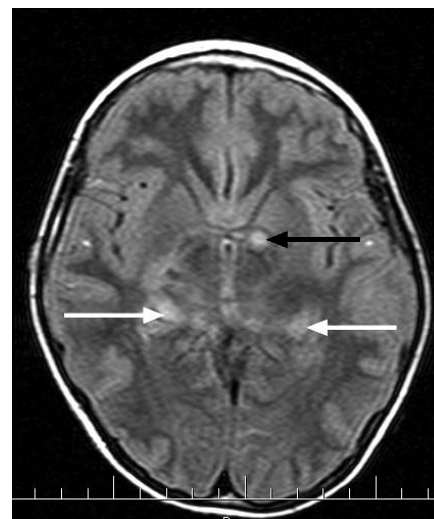


Figure 3. Characteristic foci of vacuolized myelin in basal ganglia (black arrow) and thalami (white arrows), axial FLAIR (Fluid attenuation inversion recovery) image.

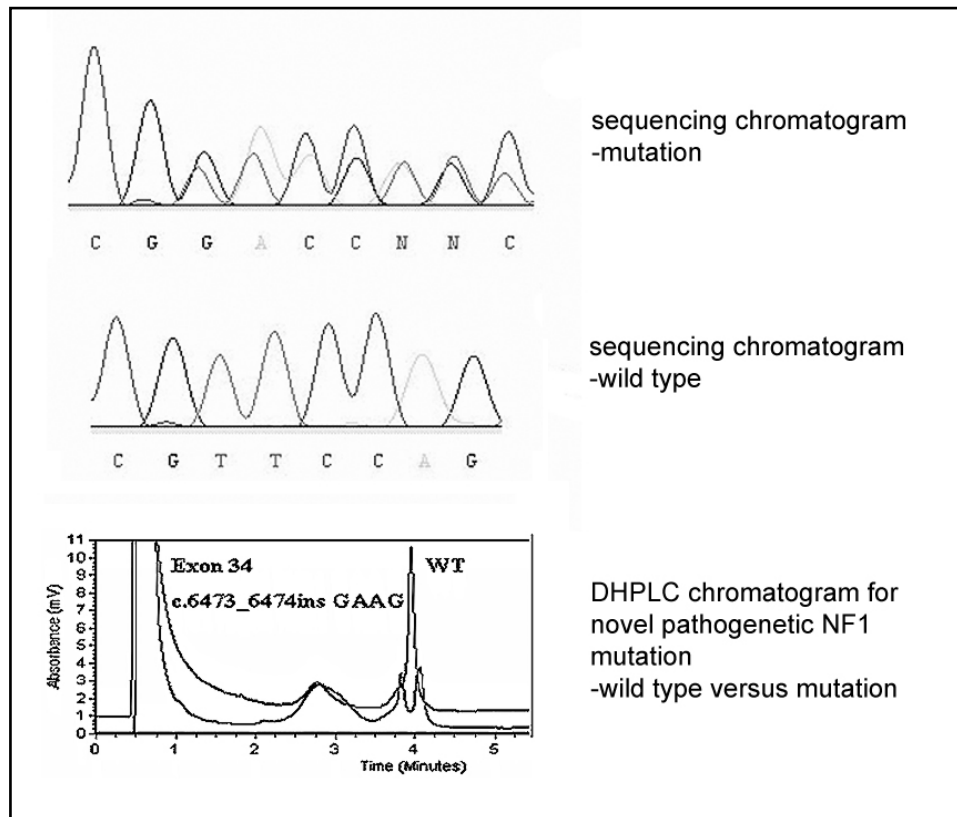


Figure 4. Sequencing chromatograms for NF1 mutation c.6473_6474ins GAAG (wild type and mutation). DHPLC chromatogram for novel pathogenic NF1 mutation (wild type versus mutation). This mutation was detected as change in the number of peaks.

not sufficient in many cases. Usually arterial reconstruction with introduction of bypasses and angioplasty is performed (Estepa *et al.*, 2001).

Children with NF1 have neurological and oncological risks. Glioma of optic nerve is a common finding (15–20%) in patients with NF1, it is asymptomatic in 2/3 of patients. There is a long-term surveillance recommended (Listernick *et al.*, 1999). In our patient, gliomas are asymptomatic, repeated cerebral MRI are without any marks of progression. Only long-term surveillance of gliomas is necessary in this case. Pubertas praecox is described in patients with NF1 and gliomas of chiasm (Habiby *et al.*, 1995). Regarding the glioma of chiasm finding she has signs of the pubertas praecox and her bone age is slightly accelerated. FASI on T2-weighted MRI of the brain are typical for NF1 (Osborn & Salzman 2004). These foci are without neurological findings, but they are probably associated with development of specific learning and behaviour disabilities (at the 30–65% of children with NF1), including language development (Billingsley *et al.*, 2003; Moore *et al.* 1996). In our patient, there are findings of many FASI, including images in characteristic localisations. Light mental retardation and severe speech development disorder had also been found. School education is possible at the special class. Common findings in children with NF1 are scoliosis,

inadequate growth and macrocephaly (Goldstein & Gutmann, 2004). Our patient possesses all of these symptoms.

NF1 is an autosomal dominant neurocutaneous disorder, with many sporadic cases.

Mutation in exon 34 of NF1 gene is novel (Bendova *et al.*, in press). Also study focused on DNA analysis findings in patients with NF1 and renovascular hypertension with mid-aortic syndrome hasn't been published yet. The same mutation in exon 34 of NF1 gene was found in the father.

CONCLUSION

NF1 is disease with multisystem involvement. Some pathological findings are signal for immediate treatment, some are just reason for a long-term surveillance.

A novel mutation in exon 34 of NF1 gene was found in our patient with NF1 and with renovascular hypertension in MAS combined with bilateral optic and chiasm glioma, speech development disorder, pubertas praecox, scoliosis and light mental retardation.

We consider the fact that her father has the same diagnosis of NF1 (including same mutation in exon 34 of NF1 gene) and that he suffered from hypertension to be very important.

ACKNOWLEDGEMENT

This work is supported by the research grants of the Ministry of the Health Care, Czech Republic – IGA MZCR NR/7926-3, VZMZ 64203, 6503.

Ministry of Health of Czech Republic gave us permission to publish results of this research.

REFERENCES

- 1 Bartosh SM, Aronson AJ. 1999. Childhood hypertension. An update on etiology, diagnosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am*, **46**, 235–252.
- 2 Bendova S, Krepelova A, Petrak B, Kinstova L, Musova Z, Rausova E, et al. 2007. Novel Mutations in the NF1 Gene in Czech Patients with Neurofibromatosis Type 1. *J Mol Neuroscience*, in press.
- 3 Billingsley RL, Jackson EF, Slopis JM, Swank PR, Mahankali S, Moore BD 3rd. 2003. Functional magnetic resonance imaging of phonologic processing in neurofibromatosis 1. *J Child Neurol*, **18**, 731–740.
- 4 Criado E, Irquiedo L, Luján S, Puras E, delMar Espino M 2002. Abdominal Aortic Coarctation, Renovascular, Hypertension, and Neurofibromatosis. *Annals of Vascular Surgery*, **16**, 363–367.
- 5 Delis KT, Gloviczki P. 2005. Middle aortic syndrome: from presentation to contemporary open surgical and endovascular treatment. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*, **17**, 187–203.
- 6 Estepa R, Gallego N, Orte L, Puras E, Aracil E, Ortuno J. 2001. Renovascular hypertension in children. *Scand J Urol Nephrol*, 388–392.
- 7 Goldstein J, Gutmann D. 2004. Neurofibromatosis type 1. In: Roach ES, Miller VS, editors. *Neurocutaneous Disorders*. Cambridge University Press, U.K. p.42–49.
- 8 Habiby R, Silverman B, Listernick R, Charrow J. 1995. Precocious puberty in children with neurofibromatosis type 1. *J Pediatr*, **126**, 364–367.
- 9 Han SS, Cooper DN, Upadhyaya MN. 2001. Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Genet*, **109**, 487–97.
- 10 Listernick R, Charrow J, Gutmann DH. 1999. Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet*, **89**, 38–44.
- 11 Moore BD 3rd, Slopis JM, Schomer D, Jackson EF, Levy BM. 1996. Neuropsychological significance of areas of high signal intensity on brain MRIs of children with neurofibromatosis. *Neurology*, **46**, 1660–1668.
- 12 Osborn A, Salzman SK, editors 2004. *Diagnostic Imaging: Brain*. Philadelphia: Hardcover. p.78–81.
- 13 diPaolo DP, Zimmerman RA, Rorke LB, Zackai EH, Bilaniuk LT, Yachnis AT. 1995. Neurofibromatosis type 1: Pathologic Substrate of High-Signal-Intensity Foci in the Brain. *Radiology*, **195**, 721–724.
- 14 Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De Raedt T, et al. 2006. Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1.100 unselected NF1 patients. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 265–76.

*Clinical Report***A Girl With Neurofibromatosis Type 1, Atypical Autism and Mosaic Ring Chromosome 17**

Marketa Havlovicova,^{1*} Drahuse Novotna,¹ Eduard Kocarek,¹ Kamila Novotna,¹ Sarka Bendova,¹ Borivoj Petrak,² Michal Hrdlicka,³ and Zdenek Sedlacek¹

¹Institute of Biology and Medical Genetics, Charles University Second Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Department of Child Neurology, Charles University Second Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

³Department of Child Psychiatry, Charles University Second Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Received 28 November 2005; Accepted 25 September 2006

We describe a girl with neurofibromatosis type 1 (NF1), mild dysmorphic features, growth and mental retardation, autism, and mosaicism of ring chromosome 17 and chromosome 17 monosomy. The extent of genetic material deleted from the ring chromosome was determined using a combination of classical cytogenetics, fluorescence in situ hybridization (FISH) and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) to be 0.6–2.5 Mb on 17p, and up to about 10 Mb on 17q. Based on our observations and on a review of the literature we argue that in addition to a universal “ring syndrome” which is based on ring instability and is less specific for the chromosome involved, various ring chromosomes underlie their own characteristic phenotypes. We propose that the symptoms leading to the diagnosis of NF1 in

our patient could be attributed to mosaic hemizyosity for the *NF1* gene in some of her somatic cells. A similar mechanism or a direct involvement of respective disease genes in the aberration could possibly influence also the development of autism and other symptoms. We raise a question if the loss of one copy of chromosome 17 from a substantial fraction of somatic cells can have specific consequences also for future risks of the patient, for example, due to the mosaic hemizyosity for the *BRCA1* and *TP53* genes. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: ring chromosome 17; ring syndrome; neurofibromatosis; autism; mental retardation; cancer susceptibility

How to cite this article: Havlovicova M, Novotna D, Kocarek E, Novotna K, Bendova S, Petrak B, Hrdlicka M, Sedlacek Z. 2007. A girl with neurofibromatosis type 1, atypical autism and mosaic ring chromosome 17. *Am J Med Genet Part A* 143A:76–81.

INTRODUCTION

Chromosomal aberrations are found in about 10–15% patients with dysmorphic features, up to 20% patients with mild or moderate mental retardation, and up to 5% patients with autism [Raynham et al., 1996; Nussbaum et al., 2001; Castermans et al., 2004]. Among the aberrations, ring chromosomes are very rare. They arise due to breaks on both arms of a chromosome, and circular re-joining of the free ends. Because of problems with proper segregation during mitosis, these chromosomes are usually unstable, and mosaics of cell lines with loss of the rings, double rings, isochromosomes, or other marker chromosomes derived from the ring are often present in carriers of this aberration [Vogel and Motulsky, 1997].

There is a debate in the literature about the mechanism of how ring chromosomes influence the phenotype. One possibility is that virtually all abnormal clinical findings in the carriers are a consequence of the ring instability. The existence of a “ring syndrome” was proposed where most of the phenotype is not specific for the chromosome

Grant sponsor: MZ CR; Grant number: MZO00064203; Grant sponsor: MSMT CR; Grant number: MSM0021620813.

*Correspondence to: Marketa Havlovicova, M.D., Institute of Biology and Medical Genetics, Charles University Second Medical School and University Hospital Motol, V uvalu 84, 15006 Prague 5, Czech Republic. E-mail: marketa.havlovicova@lfmotol.cuni.cz

DOI 10.1002/ajmg.a.31569

involved, and where the severity of the phenotype rather depends on the degree of ring instability, commonly involving growth failure due to increased mortality of the aneuploid cells [Kosztolanyi, 1987]. The other view is that the phenotype of the ring chromosome carriers is much more dependent on the genetic content of the chromosome involved, and that no universal “ring syndrome” exists. Various syndromes are described as separate clinical entities differing substantially in the degree of mental retardation, presence and severity of seizures, specific dysmorphic features, and presence of different organ defects (e.g., ring chromosome 13 syndrome, ring chromosome 20 syndrome, etc.) [Schinzel, 2001].

In this report, we present a girl whose relatively mild phenotype (neurofibromatosis type 1 (NF1), mild dysmorphic features, mental retardation, and autism) prompted us to perform a cytogenetic examination. We found mosaicism of ring chromosome 17 and chromosome 17 monosomy. As deletions in the *NF1* gene were excluded in this patient, we suggest that the symptoms leading to the diagnosis of NF1 could be attributed to mosaic hemizygoty for the *NF1* gene. We also raise a question if the loss of chromosome 17 from a substantial fraction of somatic cells of the patient can have a specific influence on the other abnormal clinical findings, and on her future specific risks.

MATERIALS AND METHODS

Clinical Report

The proband was born by a spontaneous delivery at 41 weeks of gestation as a first child to a 21-year-old woman and a 22-year-old man. The birth weight of the girl was 2,950 g (25–50th centile), and length was 48 cm (25th centile). The newborn had slightly marked mongoloid slant of palpebral fissures, café-au-lait spots, and depigmentation on the belly. Early postnatal development was uncomplicated until 4 months of age when the girl started to exhibit feeding difficulties and failure to thrive. Her psychomotor development was delayed from the beginning (sitting with support from the age of 1 year, first steps from the age of 18 months). Speech development was slightly delayed (first words after 1 year of age, simple sentences after 3 years of age, severe dyslalia). At the age of 4 years she developed epilepsy. A paternal uncle of the girl's mother committed suicide, the paternal grandfather of the girl's mother suffered from alcohol abuse, and a maternal cousin of the girl's mother had epilepsy. There was no family history of NF1 or mental retardation.

The proband (Fig. 1) was next examined at the age of 6.5 years. Her height was 104 cm (<3rd centile), weight was 16.5 kg (<3rd centile), and head



FIG. 1. The proband. **a:** Girl at the age of 9.5 years displaying mild dysmorphic features, short stature, scoliosis and skin pigmentary changes; **(b)** detailed frontal view of her face, demonstrating bitemporal narrowing, wide nasal bridge, narrow palpebral fissures, epicanthal folds, thin upper lip, downturned mouth corners, and low-set dysplastic ears; **(c)** a detail of skin pigmentary changes on the back of the patient. The most pronounced café-au-lait spots and hypopigmented macules are marked by arrows pointing upwards and downwards, respectively.

circumference was 46.5 cm (<3rd centile). She had mild dysmorphic features with brachycephaly, bitemporal narrowing, wide nasal bridge, narrow palpebral fissures, epicanthal folds, thin upper lip, widely spaced teeth, down-turned mouth corners, and low-set dysplastic ears. She presented with mild scoliosis, and her gait was wide-based. Multiple café-au-lait spots on the skin increased with age, and mild axillary and inguinal freckling was present. These findings led to the diagnosis of NF1. No cutaneous neurofibromas or plexiform neurofibromas were detected. In addition, the girl had multiple depigmented macules (leukoderma), numerous naevi depigmentosi, and a planary naevus spilus in the right lumbar region. She also had fifth finger clinodactyly and bilateral halluces valgus.

We followed her for 4 years. The mild facial dysmorphism did not change during this period, but the growth deficiency became more pronounced. The seizures worsened significantly and were classified as atypical absence epilepsy and/or astatic epilepsy, becoming intractable with poor response

to anticonvulsants. Finally, after combined antiepileptic therapy she was totally free of seizures from 9.5 years of age. On neurological examination at the age of 10 years she exhibited mental retardation, autistic features, and cognitive and language delay. She was awkward with a slow-paced gait. Other parameters were normal. Ophthalmologic examination revealed neither Lisch nodules (iris hamartomas), nor yellow flecks in the retina. Electroencephalography identified a right-sided focus of epileptiform activity in the parieto-temporal area. Magnetic resonance imaging of the brain showed no pathology. Optic glioma and high-signal intensity foci on T2-weighted images were absent.

The development of the behavioral phenotype of the girl was especially remarkable. The first psychiatric examination was performed at the age of 6.5 years. Hyperactivity and inattentiveness were the dominating symptoms. The clinical picture was not typically autistic at that time. The patient was seen by a psychiatrist at the age of 10.5 years. The reason for the admission were pronounced changes in her behavior (inappropriate smelling of things, increased aggressiveness, negativism, decreased perception of pain leading to occasional non-intentional self-injury, and an obsessive interest in observing animals and mimicking their sounds). The CARS (Childhood Autism Rating Scale) score combined with ADI-R (Autism Diagnostic Interview—Revised) results confirmed the diagnosis of atypical autism. Mental retardation was classified as moderate (IQ 45).

Cytogenetic Analysis, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

Classical cytogenetic examination of G-banded chromosomes from peripheral blood lymphocytes was performed using standard protocols. FISH analysis employed a chromosome 17 centromeric probe (D17Z1), subtelomeric probes D17S2199 and

D17S2200, and probes detecting the Miller-Dieker syndrome (*MDLS*) region (*LIS1*), the *TP53* gene (p53), and the Smith-Magenis syndrome region (*FLI*), according to the instructions of the manufacturers (Cytocell or Vysis). MLPA assays [Schouten et al., 2002] were performed to analyze the presence of subtelomeric regions on the ring chromosome using kits P019/P020, and to detect deletions in the *NF1* gene using kits P081/082, according to the instructions of the manufacturer (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

RESULTS

Cytogenetic examination of 100 mitoses showed a mosaic karyotype 46,XX,r(17)(p13;q25)[83]/45,XX,-17[12]/47,XX,r(17),+r(17)[1]/46,XX,-17,+mar1[2]/46,XX,-17,+mar2[1]/46,XX,-17,+mar3[1]. The breakpoints on the ring chromosome were located in the terminal light G-bands 17p13 and 17q25 (Fig. 2), which both correspond to about 10 Mb of DNA. The marker chromosomes differed in size, and were most likely derived from chromosome 17 (the largest were probably isochromosomes of 17q). The parents did not give consent to perform skin biopsy to assess the degree of mosaicism in another tissue of the patient. Both parental karyotypes were normal.

FISH analysis showed that regions homologous to the subtelomeric probes used for both arms (D17S2199 and D17S2200, located about 60 and 90 kb from the tip of 17p and 17q, respectively [Knight et al., 2000]) were deleted from the ring, while the *MDLS* gene, which maps approximately 2.5 Mb from the 17p telomere, was present (Fig. 3). Hybridization signals of all other chromosome 17 probes tested were also present on the ring chromosome. The results of the FISH analyses of the ring chromosome 17 can be described as 46,XX,r(17).ish r(17)(D17S2199-,LIS1+,TP53+,FL1+,D17Z1+,D17S2200-).

Genomic DNA MLPA analysis of subtelomeric regions showed the absence of one copy of both

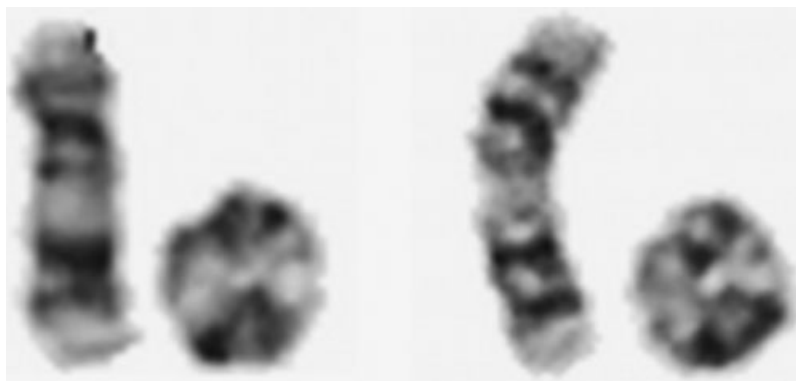


Fig. 2. Classical cytogenetic analysis. Two representative pairs of the normal and ring chromosome 17 from G-banded metaphases.

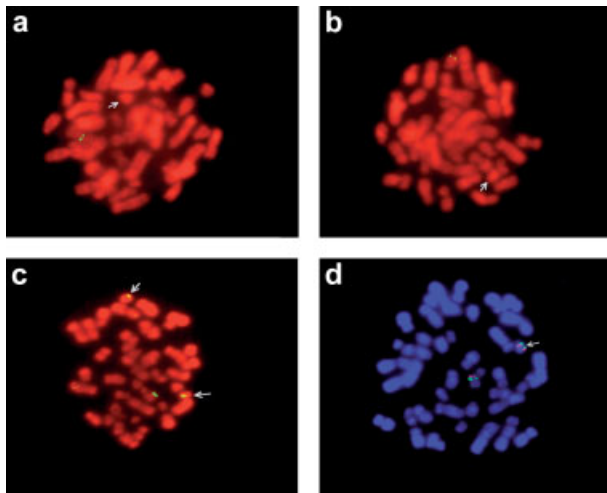


FIG. 3. FISH analysis. **a, b**: Two metaphases hybridized with the 17p and 17q subtelomeric probes, respectively, showing only one signal from the normal chromosome 17, and no signals from the ring chromosomes (arrows); **(c)** a metaphase with one normal and two ring 17 chromosomes (arrows) hybridized with the TP53 probe, showing signals on all three chromosomes; **(d)** a metaphase hybridized with the Smith-Magenis region probe (green) and with the Miller-Dieker region probe (red), showing signals of both probes both on the normal chromosome 17 and on the ring (arrow).

chromosome 17 test genes (*GEMIN4* and *SECTM1*). Compared to a normal control, the peak area was reduced to 53% and 47% for the signals from *GEMIN4* and *SECTM1*, respectively (Fig. 4). This analysis excluded the breakpoints on the ring chromosome from the most distal 640 and 700 kb of 17p and 17q, respectively. The signals from all other subtelomeric regions did not differ from the control by more than 35% as recommended as an indication of a copy number change in MLPA [Schouten et al., 2002]. Similarly, the MLPA analysis of gains and losses in the *NF1* gene was negative indicating that this gene was not affected by any gross deletions or deletions of single exons in the patient (data not shown).

DISCUSSION

We describe a girl with mosaic non-supernumerary ring chromosome 17. The extent of the missing genetic material, as delineated by a combination of cytogenetics, FISH and MLPA, was 0.6–2.5 Mb on 17p, and up to about 10 Mb on 17q. Structural abnormalities of chromosome 17, and ring chromosomes of 17 in particular, are rare. Since the first description of a patient with ring chromosome 17 [Petit and Koulischer, 1971] only a few additional cases have been reported in the literature (reviewed in Shashi et al. [2003] and Endo et al. [1999]). It is becoming evident that while patients with a deletion involving the Miller-Dieker region of 17p13.3 have lissencephaly, multiple dysmorphic features, severe

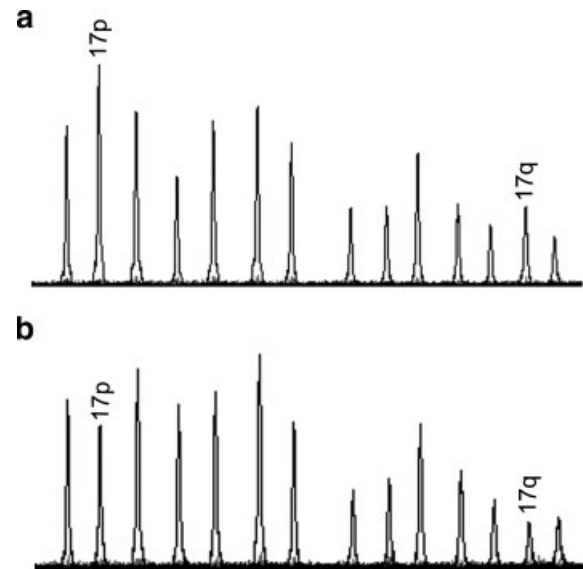


FIG. 4. MLPA analysis of subtelomeric regions. A part of the results obtained from a control DNA **(a)** and from DNA of the patient **(b)**. The peaks correspond to individual subtelomeres. Signals from both subtelomeres of chromosome 17 are significantly reduced in the patient.

mental retardation, and shortened life expectancy, patients who retain this region have a milder phenotype involving mild mental retardation, seizures, growth retardation, mild dysmorphism, and skin pigmentation changes [Shashi et al., 2003]. Our patient did not have a deletion of the Miller-Dieker region, and this finding was in accordance with her relatively mild clinical presentation.

Spectrum and severity of symptoms in patients with ring chromosomes can be determined by two factors. First, the aberration itself can influence gene expression in multiple ways. Genes distal to the breakpoints are lost, and patients can suffer from haploinsufficiency or from unmasking of recessive mutations on the remaining alleles. Genes spanning the deletion/fusion breakpoints can be interrupted or fused, resulting in possible gain-of-function effects. Finally, genes located in the vicinity of the breakpoints can be separated from their regulatory regions. The impact of chromosome circularization on the phenotype may thus vary depending on the size and content of the deleted segments, and on the location and nature of the breakpoints. Second, due to problems with chromatid separation, ring chromosomes are mitotically unstable, and give rise to a spectrum of secondary chromosomal defects including spectrum monosomy, double rings, and marker chromosomes [Vogel and Motulsky, 1997]. Various cell lines coexist within the patient in a mosaic state, and the phenotype can depend on the composition and frequency of mosaicism, and its distribution in different tissues [Nishiwaki et al., 2005]. Because of

the instability of the ring chromosomes it was proposed that carriers, irrespective of the chromosome involved, suffer from a universal "ring syndrome" [Kosztolanyi, 1987]. The main symptom is growth retardation due to increased mortality of the aneuploid cells, accompanied by mild mental retardation, dysmorphism, and pigmentation changes.

The presence of the above symptoms in carriers of different ring chromosomes often mistakenly lead to the diagnosis of NF1. Our patient meets the NF1 criteria [Gutmann et al., 1997] with café-au-lait spots and axillary and inguinal freckling. The diagnosis of NF1 on the background of mosaicism for chromosome 17 monosomy raises the question if the skin pigmentation anomalies arise as an unspecific manifestation of the "ring syndrome," or if this phenotype is specifically related to the loss of one copy of the *NF1* gene (which maps to 17q11) from the population of monosomic cells. It is conceivable that the 12% mosaicism for chromosome 17 monosomy identified in blood of the patient can have consequences similar to those described in patients with NF2 who have 6% or even lower mosaicism for monosomy of chromosome 22 (and of the *NF2* gene in 22q12) [Tsilchorozidou et al., 2004]. This conclusion is further supported by excluding a coincidental independent rearrangement of the *NF1* gene in our patient by MLPA analysis.

In addition to several patients with ring chromosome 17 and NF1 (reviewed in Shashi et al. [2003]), a patient with this aberration and carcinoma of breast and ovary has been described [Wiktor et al., 1993]. Similarly, several cases of ring chromosome 22 were associated with NF2 and increased cancer susceptibility [Luciani et al., 2003; Tsilchorozidou et al., 2004]. Cancer was also associated with ring chromosomes 11 and 13 [Tommerup and Lothe, 1992]. Similar to the latter authors, we propose that these findings may not be chance coincidences, and that the phenotypes are caused by loss of one copy of the respective disease gene (*BRCA1*, *NF2*, *SNF5* or *CHEK2*, *WT1*, and *RB1*) in monosomic cells arising due to ring instability. Resolving the question of specific symptoms associated with specific ring chromosomes is very important from the clinical point of view. Our patient could, for example, be at increased risk of cancer due to her mosaicism for cells with loss of one allele of *TP53* and *BRCA1*, similar to patients with germline mutations in these tumor suppressor genes.

Our patient was also diagnosed with atypical autism and mental retardation. Although these conditions may belong to non-specific symptoms associated with many chromosomal aberrations, it is interesting that several genome screens pointed to various portions of chromosome 17q or 17p as to potential regions harboring autism susceptibility genes [Risch et al., 1999; IMGSAC (International

Molecular Genetic Study of Autism Consortium), 2001; Yonan et al., 2003], and that breakpoints in 17p13 have been observed in Asperger syndrome [Tentler et al., 2003]. It is tempting to speculate about a causal link here as well.

Deletions in regions with imprinted genes can also have consequences potentially even more serious than those associated with loss of a biparentally expressed gene. It may be of interest in this context that the most terminal part of 17q, which may be deleted in our patient, was suggested to contain maternally imprinted gene(s) [Rio et al., 2001]. Finally, as it becomes more and more recognized for broadening spectra of genetic disorders, the phenotypic effects of any genetic defect are likely to be influenced by the genotype of the patient at other loci (genetic background), and by environmental factors. These factors can underlie a part of the inter-individual phenotypic variability observed among the ring chromosome carriers.

In conclusion, the clinical and laboratory findings in our patient suggest that although some phenotypic features observed could be a non-specific manifestation of the "ring syndrome," her diagnosis of NF1 may be specifically related to her mosaic chromosome 17 monosomy and loss of one of the copies of the *NF1* gene from a significant proportion of somatic cells. This mechanism or a direct involvement of respective disease genes in the aberration may play a role also in the development of other symptoms including autism.

REFERENCES

- Castermans D, Wilquet V, Steyaert J, Van de Ven W, Fryns JP, Devriendt K. 2004. Chromosomal anomalies in individuals with autism: A strategy towards the identification of genes involved in autism. *Autism* 8:141–161.
- Endo A, Uesato T, Minato M, Takada M, Takahashi S, Harada K. 1999. Ring chromosome 17 syndrome with monosomy 17 mosaicism: Case report and literature review. *Acta Paediatr* 88:1040–1043.
- Gutmann DH, Alysworth A, Carey JC. 1997. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 278:51–57.
- IMGSAC (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium). 2001. A genomewide screen for autism: Strong evidence for linkage to chromosomes 2q, 7q, and 16p. *Am J Hum Genet* 69:570–581.
- Knight SJ, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DL, Nguyen H, Hudson TJ, Riethman HC, Ledbetter DH, Flint J. 2000. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 67:320–332.
- Kosztolanyi G. 1987. Does "ring syndrome" exist? An analysis of 207 case reports on patients with a ring autosome. *Hum Genet* 75:174–179.
- Luciani JJ, de Mas P, Depetris D, Mignon-Ravix C, Bottani A, Prieur M, Jonveaux P, Philippe A, Bourrouillou G, de Martinville B, Delobel B, Vallee L, Croquette MF, Mattei MG. 2003. Telomeric 22q13 deletions resulting from rings, simple deletions, and translocations: Cytogenetic, molecular, and clinical analyses of 32 new observations. *J Med Genet* 40:690–696.

- Nishiwaki T, Hirano M, Kumazawa M, Ueno S. 2005. Mosaicism and phenotype in ring chromosome 20 syndrome. *Acta Neurol Scand* 111:205–208.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. 2001. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, 6th edition. Philadelphia: Saunders. p 350.
- Petit P, Koulischer L. 1971. Study of a 46,XX-46,XX,17r mosaicism. *Ann Genet* 14:55–58.
- Raynham H, Gibbons R, Flint J, Higgs D. 1996. The genetic basis for mental retardation. *QJM* 89:169–175.
- Rio M, Ozilou C, Cormier-Daire V, Turleau C, Prieur M, Vekemans M, Chauveau P, Munnich A, Colleaux L. 2001. Partial maternal heterodisomy of chromosome 17q25 in a case of severe mental retardation. *Hum Genet* 108:511–515.
- Risch N, Spiker D, Lotspeich L, Nouri N, Hinds D, Hallmayer J, Kalaydjieva L, McCague P, Dimiceli S, Pitts T, Nguyen L, Yang J, Harper C, Thorpe D, Vermeer S, Young H, Hebert J, Lin A, Ferguson J, Chiotti C, Wiese-Slater S, Rogers T, Salmon B, Nicholas P, Petersen PB, Pingree C, McMahon W, Wong DL, Cavalli-Sforza LL, Kraemer HC, Myers RM. 1999. A genomic screen of autism: Evidence for a multilocus etiology. *Am J Hum Genet* 65:493–507.
- Schinzel A. 2001. *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man*, 2nd edition. Berlin: De Gruyter. p 9.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57.
- Shashi V, White JR, Pettenati MJ, Root SK, Bell WL. 2003. Ring chromosome 17: Phenotype variation by deletion size. *Clin Genet* 64:361–365.
- Tentler D, Johannesson T, Johannesson M, Rastam M, Gillberg C, Orsmark C, Carlsson B, Wahlstrom J, Dahl N. 2003. A candidate region for Asperger syndrome defined by two 17p breakpoints. *Eur J Hum Genet* 11:189–195.
- Tommerup N, Lothe R. 1992. Constitutional ring chromosomes and tumour suppressor genes. *J Med Genet* 29:879–882.
- Tsilchorozidou T, Menko FH, Laloo F, Kidd A, De Silva R, Thomas H, Smith P, Malcolmson A, Dore J, Madan K, Brown A, Yovos JG, Tsiligopoulos M, Vogiatzis N, Baser ME, Wallace AJ, Evans DG. 2004. Constitutional rearrangements of chromosome 22 as a cause of neurofibromatosis 2. *J Med Genet* 41:529–534.
- Vogel F, Motulsky AG. 1997. *Human genetics. Problems and approaches*, 3rd edition. Berlin: Springer. p 54.
- Wiktor A, Van Dyke DL, Weiss L. 1993. Characterization of a de novo 48,XX,+r(X),+r(17) by in situ hybridization in a patient with neurofibromatosis (NF1). *Am J Med Genet* 45:22–24.
- Yonan AL, Alarcon M, Cheng R, Magnusson PK, Spence SJ, Palmer AA, Grunn A, Juo SH, Terwilliger JD, Liu J, Cantor RM, Geschwind DH, Gilliam TC. 2003. A genomewide screen of 345 families for autism-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 73:886–897.

The Importance of Advanced Parental Age in the Origin of Neurofibromatosis Type 1

Marta Snajderova,¹ Vincent M. Riccardi,² Borivoj Petrak,^{3*} Daniela Zemkova,¹ Jirina Zapletalova,⁴ Tonko Mardesic,⁵ Alena Petrakova,⁶ Vera Lanska,⁷ Tatiana Marikova,⁸ Sarka Bendova,⁸ Marketa Havlovicova,⁸ and Marie Kaluzova³

¹Department of Pediatrics, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Charles University, Prague, Czech Republic

²The Neurofibromatosis Institute, La Crescenta, California

³Department of Child Neurology, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Charles University, Prague, Czech Republic

⁴Department of Pediatrics, Palacky University, Medical School and University Hospital, Olomouc, Czech Republic

⁵Department of Reproductive Medicine, Sanatorium Pronatal, Prague, Czech Republic

⁶European Center for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden

⁷Department of Statistics, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁸Institute of Biology and Medical Genetics, Charles University, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Received 12 February 2011; Accepted 9 November 2011

Von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) is an autosomal dominant disorder with a prevalence about 1/3,000 (1/2,000–1/5,000 in various population-based studies). About 30–50% of cases are sporadic, resulting from a new mutation. NF1 is fully penetrant by mid-childhood, stigmata, and medical problems (neurological, dermatological, endocrine, ophthalmological, oncological) are highly variable. Advanced paternal age (APA) has been known to increase the risk of new germline mutations that contribute to the presence of a variety of genetic diseases in the human population. The trend in developed countries has been toward higher parental age due to various reasons. In a cross-sectional study, in two university hospital centers, data on parental age of 103 children (41 female) born between 1976 and 2005 with sporadic NF1 were analyzed. Parental age at birth was compared with the Czech general population matched to birth year. The mean NF1 sporadic case paternal age at birth was 32.0 years (95% CI 30.7–33.3 years) compared with 28.8 years (95% CI 28.6–29.1 years) in the general population ($P < 0.001$). The mean maternal age at birth was 27.4 years (95% CI 26.3–28.5 years) compared with 25.8 years (95% CI 25.5–26.0 years) in the general population ($P < 0.05$). The case-control difference in the father's age was higher than it was for the mother's age. Sporadic NF1 cases accounted for 35.6% of our entire NF1 cohort. We confirmed an association of advanced parental and particularly paternal age with the occurrence of sporadic NF1.

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: parental age; advanced paternal age; advanced maternal age; neurofibromatosis type 1; sporadic cases

How to Cite this Article:

Snajderova M, Riccardi VM, Petrak B, Zemkova D, Zapletalova J, Mardesic T, Petrakova A, Lanska V, Marikova T, Bendova S, Havlovicova M, Kaluzova M. 2011. The importance of advanced parental age in the origin of neurofibromatosis type 1.

Am J Med Genet Part A.

INTRODUCTION

Von Recklinghausen neurofibromatosis or neurofibromatosis type 1 (NF1), is an autosomal dominant disorder with a prevalence of about 1/3,000 (1/2,000–1/5,000 in various population-based studies) [Rasmussen and Friedman, 2000].

NF1 is highly variable [Friedman, 1999; Goldstein and Gutmann, 2004; Williams et al., 2009]. Typical manifestations are café-au-lait skin spots, freckling, peripheral nerve sheath tumors (benign: Neurofibromas; malignant: Neurofibrosarcomas) and other malig-

*Correspondence to:

Borivoj Petrak, MD, PhD, Department of Child Neurology, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Charles University, V Uvalu 84, 150 06, Prague 5, Czech Republic. E-mail: borivoj.petrak@post.cz

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/ajmg.a.34413

nancies (intracranial astrocytomas, gastrointestinal stromal tumors, pheochromocytomas, and juvenile monocytic leukemia) [Ferner et al., 2007; Theos and Korf, 2006]. Endocrine symptoms (abnormal thyroid functioning, growth hormone deficiency, and pubertal disorders) are relatively frequent. Neurological and ophthalmological problems may manifest depending on localization of tumors [Ferner et al., 2007].

NF1 is caused by mutations within or deletion of the *NF1* gene at 17q11.2. The *NF1* gene encodes the protein neurofibromin, which is a negative regulator of the Ras oncogene [Rasmussen and Friedman, 2000].

About 30–50% cases are sporadic and assumed to result from a new mutation [Table I]. There are families documented with more than one sporadic case, each having a distinct *NF1* mutation [Klose et al., 1999; Upadhyaya et al., 2003]. Obviously, nonpaternity should also be considered in such cases. In addition, parental mosaicism for an *NF1* mutation involving the germline may occasionally account for an “apparently” sporadic case [Detjen et al., 2007; Kaplan et al., 2010]. About 80% of intragenic *NF1* mutations are paternal in origin, and only about 20% of whole gene deletions are paternal in origin [Lazaro et al., 1996; Upadhyaya et al., 1998]. This may be an important confounder given that about 4% of NF1 cases may be due to a whole gene deletion [Kluwe et al., 2004].

Advanced parental age increases the risk to develop genetic diseases. Over the last two decades, the trend in developed countries has been toward higher parental age due to various factors (family finances, parental education, divorce rates, and reproductive disorders).

An age of a father at the time of conception of ≥ 40 years and that of mother >35 years is considered as advanced parental age, [Friedman, 1981; de la Rochebrochard and Thonneau, 2003; Toriello and Meck, 2008]. Advanced paternal age (APA) increases the risk of new germline mutations. The male germ line is expected to accumulate point mutations due to replication errors and

reduced activity of repair enzymes, strand mispairing of short tandem repeats, and longer exposure to environmental mutagens [Thomas, 1996; Crow, 2000]. In addition, in human sperm DNA is more methylated than oocyte DNA, which may account for the greater number of paternally derived point mutations occurring within a CpG dinucleotide [Driscoll and Migeon, 1990; Glaser and Jabs, 2004]. APA has been associated with increased fetal death [Nybo Andersen et al., 2004], and with infertility [de la Rochebrochard and Thonneau, 2003], as evident in achondroplasia [Toriello and Meck, 2008], the Apert, Crouzon, and Pfeiffer syndromes [Glaser and Jabs, 2004], bipolar disorders [Frans et al., 2008], schizophrenia [Byrne et al., 2003], and autism [Reichenberg et al., 2006]. Risch et al. [1987] and lately Glaser and Jabs [2004] distinguished mutations in disorders with a strong APA effect from mutations weakly associated with APA, the latter including NF1.

Because of more cell divisions over a prolonged period during spermatogenesis compared to oogenesis the mutation rate for single-locus mutations is higher in men than in women and increases with paternal age [Crow, 1997]. Friedman [1981] calculated the risk for de novo autosomal dominant mutations to be 0.3–0.5% among the offspring of fathers aged >40 years.

Studies on effects of APA in sporadic NF1 have been either inconclusive [Huson et al., 1989; Samuelsson and Akesson, 1989; Takano et al., 1992; Bunin et al., 1997], or have confirmed an APA effect for sporadic NF1 [Sergeyev, 1975; Riccardi et al., 1984; Poyhonen et al., 2000]. We assessed the advanced parental age effect and especially APA effect on the incidence of sporadic NF1 in three decades in the Czech Republic.

MATERIALS AND METHODS

In a cross-sectional study, we assessed parental age in 103 children (41 females) with sporadic NF1 born between 1976 and 2005. Only

TABLE I. Frequency of the Sporadic Cases of Neurofibromatosis Type 1

Author (year)	NF1 patients (n)	Age of patients at the time of evaluation (years)	Sporadic NF1 cases (n)	Sporadic case frequency
Sergeyev [1975]	58 ^a	3–70	46 ^a	46/58 (79.3%)
Riccardi et al. [1984]	421	X	187	187/421 (44.4%) ^b
Samuelsson and Akesson [1989]	57	X	29	29/57 (50.9%) ^b
Huson et al. [1989]	135	X	41 ^c	41/135 (30.4%) ^{b,c}
Clementi et al. [1990]	110 ^b	0.2–40	54 ^b	54/110 (49.1%) ^b
Takano et al. [1992]	26	4–36 ^b	13	13/26 (50.0%)
Rodenhiser et al. [1993]	58	X	24	24/58 (41.4%)
North [1993]	144	0–68	66	66/144 (45.8%)
McGaughan et al. [1999]	459	0–74	132	132/459 (28.8%)
Poyhonen et al. [2000]	197	0.2–60	77 ^b	77/197 (39.1%) ^b
Present study Snajderova et al. [2011]	275 ^d	≤ 18	98 ^d	98/275 (35.6%) ^d

^acomplete investigation.

^bcalculated from data presented in reference.

^cdirect method, X: Not evaluated.

^dincluded data of 98 children from Department of Child Neurology, University Hospital Motol, Prague.

patients with sporadic NF1 younger than 18 years at the time of first examination, who fulfilled NIH criteria for NF1 [NIH Consensus Development Conference, 1988], were enrolled. For all patients the family history was negative. Parents and siblings were examined by NF1 specialists (neurologist, geneticist, endocrinologist, ophthalmologist, and/or dermatologist) and showed no signs of NF1.

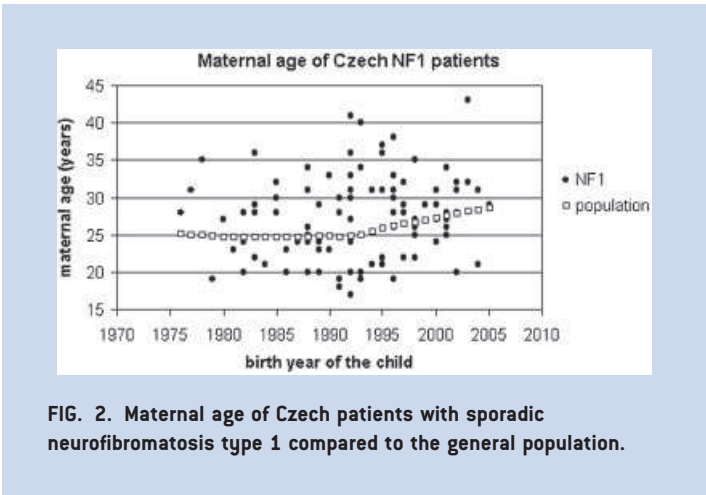
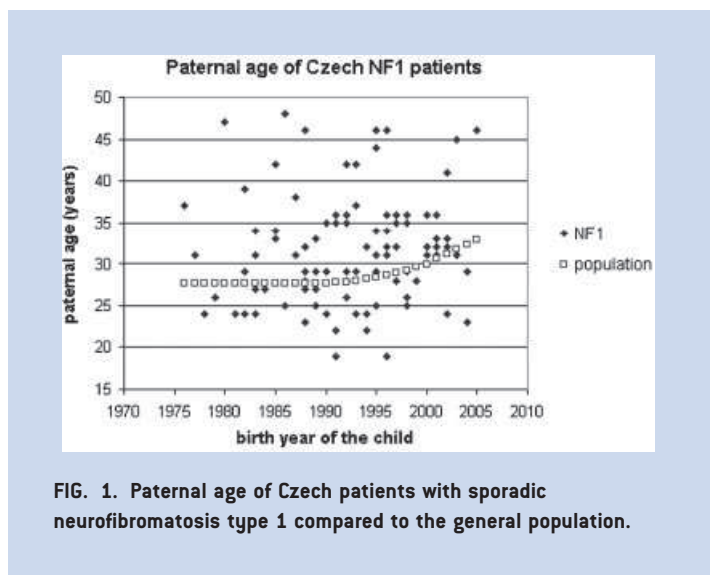
All children were Caucasians and born in the Czech Republic. Most were seen in the Clinic for Children with Neurocutaneous Disorders in Prague which provides care to the majority of NF1 children since 1990. Data on maternal and paternal ages were compared with the general age of parents in the Czech population matched to year of birth of each NF1 child (Registry of the National Institute of Healthcare Information and Statistics). Molecular analysis was performed in 20 of the 103 patients [Bendova et al., 2007].

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD, $P < 0.05$ was considered to be significant. Means and their 95% confidence intervals were used for description of age and a one-sample t -test was used for testing the null hypothesis. Hotelling's t -test was used for simultaneous testing of equality between groups. A χ^2 goodness of fit test was used for comparison of empirical distribution of the appearance of NF1 in time course to the theoretical uniform distribution.

RESULTS

The proportion of sporadic cases among the NF1 group was 35.6% (98/275). Whereas the paternal age in the Czech population increased significantly since 1990 ($P < 0.001$), such a trend was not observed in fathers (Fig. 1) and mothers (Fig. 2) of NF1 sporadic cases. The mean paternal age at birth of NF1 sporadic cases was 32.0 years (range 19.2–48.3 years; 95% confidence interval (CI) 30.7–33.3 years), while in the general population (matched to birth years) the mean paternal age was 28.8 years (95% CI 28.6–29.1 years) ($P < 0.001$). Fourteen out of 103 fathers (13.6%) were ≥ 40 years old (Fig. 3).



Mean maternal age at time of birth was 27.4 years (range 17.3–43.1; 95% CI 26.3–28.5 years). In the general population (matched to birth years) the mean maternal age was 25.8 years (95% CI 25.5–26.0 years). Eight out of 103 mothers (7.8%) were ≥ 35 years old (Fig. 3). In four out of 103 sets of parents (3.9%), the maternal age at birth was >35 years while the paternal age was >40 years.

Simultaneous testing of parents' ages (maternal and paternal) for NF1 and the general population using Hotelling's t -test rejects the null hypotheses of equivalence on the significance level ($P < 0.001$).

DISCUSSION

The frequency of sporadic NF1 cases in our group was 35.6%. In literature the frequency varies from 30% to 50% (Table I). Familial

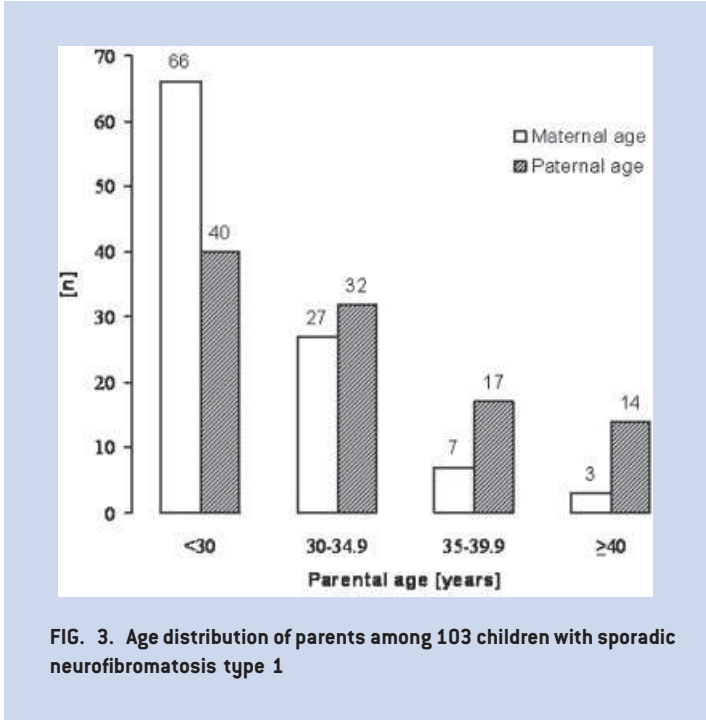


TABLE II. Parental Age in Previous Studies on Children With Sporadic Neurofibromatosis Type 1

Author (year)	Sporadic NF1 cases (n)	Structure of NF1 group	Controls (method)	Mean paternal age (years)	Paternal age difference (years)	Statistics (P value)	Mean maternal age (years)	Maternal age difference (years)	Statistics (P value)
Sergeyev [1975]	46	CH + A	pop	29.8	2.0	0.03	29.9	1.5	0.08
Riccardi et al. [1984]	187	X	pop	32.8	3.2	<0.001	27.4	1.4	<0.001
Samuelsson and Akesson [1989]	29 ^a	CH + A	pop	37.1	3.5	ns	31.7	0.2 ^a	ns
Huson et al. [1989]	21 ^b	X	pop	29.6	-0.3	0.8	27.7	0.1	0.95
Jadayel et al. [1990]	14	CH + A	pop	29.8	-0.2	ns	X	X	X
Takano et al. [1992]	13	CH + A	pop	35.4	4.5 ^a	0.08	30.9	4.0	0.40
Bunin et al. [1997]	89	CH	case-control	29.9	1.5	0.07	26.6	0.9	0.20
Poyhonen et al. [2000]	77 ^a	CH + A	pop	33.0	3.0	0.008	30.0	2.5	0.006
Present study	103	CH	pop	32.0	3.2	<0.001	27.4	1.7	<0.05
Snajderova et al. [2011]									

pop: General population data, ns: Not significant, X: Not evaluated, CH: Children, A: Adults

^acalculated from data presented in reference.

^bonly in 21 of 41 new NF1 mutations data were available and used in analysis.

cases may be more common than expected because mildly affected family members might have been overlooked without a systematic and experienced clinical examination [Poyhonen et al., 2000].

We analyzed the influence of parental age on incidence of the NF1 in the period 1976–2005. During the last two decades an increasing parental age in the Czech population was observed. Whereas the paternal and maternal age in the general Czech population has been significantly increasing since 1990, an overall similar trend was not apparent in fathers (Fig. 1) and mothers (Fig. 2) of sporadic NF1 children. The number of sporadic NF1 cases born during 1976–1985 compared to the number of those born in 1986–2005 is consistent with an increased incidence. It is also possible that in the earlier period mildly affected patients may have been missed.

The mean age of mothers of sporadic NF1 patients was higher than in the general population (difference 1.7 years; $P < 0.05$), as reported previously [Riccardi et al., 1984; Poyhonen et al., 2000]. The paternal age case-control difference was 3.2 years ($P < 0.001$). The majority of other authors present age difference of 1.5–4.5 years (Table II). Still, only 13.6% of fathers and 7.8% of mothers in our cohort fulfilled criteria of advanced parental age.

Risch et al. [1987] and Glaser and Jabs [2004] distinguished disorders with a strong and weak APA effect: In disorders with a strong APA effect, the fathers of affected children were 5–7 years older compared to the general population, in the disorders with a weak association the fathers were 2–5 years older. In the present study the paternal age difference was 3.2 years. Our results confirm the advanced parental age effect in sporadic NF1, particularly of paternal age.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a Research Project of the Ministry of Health of the Czech Republic MZ0FNM2005, 6503 and the

Academy of Sciences of the Czech Republic AVCR1ET 101210513, GAUK200072.

REFERENCES

- Bendova S, Krepelova A, Petrak B, Kinstova L, Musova Z, Rausova E, Marikova T. 2007. Novel mutations in the NF1 gene in Czech patients with neurofibromatosis type 1. *J Mol Neurosci* 31:273–280.
- Bunin GR, Needle M, Riccardi VM. 1997. Paternal age and sporadic neurofibromatosis 1: A case-control study and consideration of the methodic issues. *Genet Epidemiol* 14:507–516.
- Byrne M, Agerbo E, Ewald H, Eaton WW, Mortensen PG. 2003. Parental age and risk of schizophrenia: A case-control study. *Arch Gen Psychiatr* 60:673–678.
- Clementi M, Barbujani G, Turolla L, Tenconi R. 1990. Neurofibromatosis-1: A maximum likelihood estimation of mutation rate. *Hum Genet* 84:116–118.
- Crow JF. 1997. The high spontaneous mutation rate: Is it a health risk? *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8380–8386.
- Crow JF. 2000. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet* 1:40–47.
- de la Rochebrochard E, Thonneau P. 2003. Paternal age $>$ or $=$ 40 years: An important risk factor for infertility. *Am J Obstet Gynecol* 189:901–915.
- Detjen AK, Tinschert S, Kaufmann D, Algermissen B, Nurnberg P, Schuelke M. 2007. Analysis of mitochondrial DNA in discordant monozygotic twins with neurofibromatosis type 1. *Twin Res Hum Genet* 10:486–495.
- Driscoll DJ, Migeon BR. 1990. Sex difference in methylation of single-copy genes in human meiotic germ cells: Implications for X chromosome inactivation, parental imprinting and origin of CpG mutations. *Somat Cell Mol Genet* 16:267–282.
- Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, Upadhyaya M, Towers R, Gleeson M, Steiger C, Kirby A. 2007. Guidelines for diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 44:81–88.DOI: 10.1136/jmg.2006.045906.

- Frans EM, Sandin S, Reichenberg A, Lichtenstein P, Langstrom N, Hultman CM. 2008. Advancing paternal age and bipolar disorders. *Arch Gen Psychiatr* 65:1034–1040.
- Friedman JM. 1981. Genetic disease in the offspring of older fathers. *Obstet Gynecol* 57:745–749.
- Friedman JM. 1999. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet (Semin Med Genet)* 89:1–6.
- Glaser RL, Jabs EW. 2004. Dear Old Dad. *Sci Aging Knowl Environ* 3: <http://sageke.sciencemag.org/cgi/content/full/2004/3/re1>, DOI: 10.1126/sageke.2004.3.re1.
- Goldstein J, Gutmann D. 2004. Neurofibromatosis type 1. In: Roach ES, Miller VS, editors. *Neurocutaneous disorders*. Cambridge: University Press. pp. 42–49.
- Huson SM, Compston DAS, Clark P, Harper PS. 1989. A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in South East Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. *J Med Genet* 26:704–711.
- Jadayed D, Fain P, Upadhyaya M, Ponder MA, Huson SM, Carey J, Fryer A, Mathew CG, Barker DF, Ponder BA. 1990. Paternal origin of new mutations in Von Recklinghausen neurofibromatosis. *Nature* 343:558–559.
- Kaplan L, Foster R, Shen Y, Parry DM, McMaster ML, O'Leary MC, Gusella JF. 2010. Monozygotic twins discordant for neurofibromatosis 1. *Am J Med Genet Part A* 152A:601–606.
- Klose A, Peters H, Hoffmeyer S, Buske A, Lüder A, Hess D, Lehmann R, Nürnberg P, Tinschert S. 1999. Two independent mutations in a family with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Am J Med Genet* 83:6–12.
- Kluwe L, Siebert R, Gesk S, Friedrich RE, Tinschert S, Kehrer-Sawatzki H, Mautner VF. 2004. Screening 500 unselected neurofibromatosis 1 patients for deletions of the Nf1 gene. *Hum Mutat* 23:111–116.
- Lazaro C, Gaona A, Ainsworth P, Tenconi R, Vidaud D, Kruyer H, Ars E, Volpini V, Estivill X. 1996. Sex differences in mutational rate and mutational mechanism in the NF1 gene in neurofibromatosis type 1 patients. *Hum Genet* 98:696–699.
- McGaughan JM, Harris DI, Donnai D, Teare D, MacLeod R, Westerbeek R, Kingston H, Super M, Harris R, Evans DG. 1999. A clinical study of type 1 neurofibromatosis in North West England. *J Med Genet* 36:197–203.
- National Institute of Health Consensus Development Conference. 1988. Neurofibromatosis: Conference statement. *Arch Neurol* 45:575–578.
- North K. 1993. Neurofibromatosis Type 1: Review of the First 200 Patients in an Australian clinic. *J Child Neurol* 8:395–402.
- Nybo Andersen AM, Hansen KD, Andersen PK, Davey Smith G. 2004. Advanced paternal age and risk of fetal death: A cohort study. *Am J Epidemiol* 160:1214–1222.
- Poyhonen M, Kytölä S, Leisti J. 2000. Epidemiology of neurofibromatosis type 1 (NF1) in northern Finland. *J Med Genet* 37:632–636.
- Rasmussen SA, Friedman JM. 2000. NF1 gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol* 151:33–40.
- Reichenberg A, Gross R, Weiser M, Bresnahan M, Silverman J, Harlap S, Rabinowitz J, Shulman C, Malaspina D, Lubin G, Knobler HY, Davidson M, Susser E. 2006. Advancing paternal age and autism. *Arch Gen Psychiatry* 63:1026–1032.
- Riccardi VM, Dobson CE II, Chakraborty R, Bontke C. 1984. The Pathophysiology of Neurofibromatosis: IX. Paternal Age as a Factor in the Origin of New Mutations *Am J Med Genet* 18:169–176.
- Risch R, Reich EW, Wishnick MW, McCarthy JG. 1987. Spontaneous mutation and parental age in humans. *Am J Hum Genet* 41:218–248.
- Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, Coulter-Mackie MB, Singh SM, Jung JH. 1993. A genetic study of neurofibromatosis type 1 (NF1) in south-western Ontario. II A PCR based approach to molecular and prenatal diagnosis using linkage. *J Med Genet* 30:363–368.
- Samuelsson B, Akesson HO. 1989. Neurofibromatosis in Gothenburg, Sweden. IV. Genetic analyses. *Neurofibromatosis* 2:107–115.
- Sergeyev AS. 1975. On the mutation rate of neurofibromatosis. *Hum Genet* 28:129–138.
- Takano T, Kawashima T, Yamanouchi Y, Kitayama K, Baba T, Ueno K, Hamaguchi H. 1992. Genetics of neurofibromatosis 1 in Japan: Mutation rate and paternal age effect. *Hum Genet* 89:281–286.
- Theos A, Korf BR. 2006. Pathophysiology of Neurofibromatosis Type 1. *Ann Intern Med* 144:842–849.
- Thomas GH. 1996. High male:female ratio of germ-line mutations: An alternative explanation for postulated gestational lethality in males in X-linked dominant disorders. *Am J Hum Genet* 58:1364–1368.
- Toriello HV, Meck JM. 2008. Statement on guidance for genetic counselling in advanced paternal age. *Genet Med* 10:457–460.
- Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, Osborn M, Hartog C, Mudd S, Penttinen M, Cordeiro I, Ponder M, Ponder BA, Krawczak M, Cooper DN. 1998. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Hum Genet* 102:591–597.
- Upadhyaya M, Majounie E, Thompson P, Han S, Consoli C, Krawczak M, Cordeiro I, Cooper DN. 2003. Three different pathological lesions in the NF1 gene originating de novo on a family with neurofibromatosis type 1. *Hum Genet* 112:12–17.
- Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. 2009. Neurofibromatosis type 1 revisited. *Pediatrics* 123:124–133.

Idiopatická stenosa akveduktu a porucha vývoje řeči u dětí s neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1

Kalužová M.¹, Petrák B.¹, Lisý J.², Vaculík M.³, Bendová Š.⁴, Komárek V.¹

¹Klinika dětské neurologie UK 2. LF a FN Motol

²Klinika zobrazovacích metod, UK 2. LF a FN Motol

³Oddělení neurochirurgie, UK 2. LF a FN Motol

⁴Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN Motol

Abstrakt

Neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1 (NF1) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění z okruhu neurokutánních syndromů, s incidencí 1:2500 - 3000 a vysokým výskytem nových mutací. Jedná se o onemocnění s multisystémovým postižením organismu s častým výskytem nádorů. Hydrocefalus se u těchto pacientů vyskytuje buď sekundárně při expanzivním procesu mozku nebo při idiopatické stenose akveduktu. U dětí se velmi často vyskytují vývojové poruchy učení, chování a poruchy vývoje řeči. Předkládáme kazuistiku dvou dětí s NF1 se současným výskytem těžké poruchy vývoje řeči a hydrocefalu při idiopatické stenose akveduktu. U jednoho z dětí došlo k rozvoji stenosis během sledování. Současný výskyt těžké poruchy řeči a hydrocefalu při idiopatické stenose akveduktu nebyl zatím popsán.

Neurofibromatosis von Recklinghausen type 1 (NF1) is an autosomal dominant neurocutaneous disorder, with incidence 1: 2500 - 3000 and a high rate of new mutations. It is multisystem disorder with frequent tumour incidence. Brain expansive lesions or idiopathic aqueductal stenosis could lead to hydrocephalus in NF1 patients. Learning disability, behaviour problems and speech development disorder are common problems in NF1 children. We are presenting two case reports of NF1 children with speech development disorder and hydrocephalus according to idiopathic aqueductal stenosis. One children developed hydrocephalus during follow up. Coincidence of hydrocephalus due to idiopathic aqueductal stenosis and severe speech development disorder was not described yet.

Klíčová slova

Neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1, hydrocefalus, stenosa akveduktu, porucha vývoje řeči

Zkratky

NF1 = Neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1

FASI = foci of altered signal intensity

KDN FN Motol = Klinika dětské neurologie UK 2. LF a FN Motol

n = nerv

Úvod

Neurofibromatosis von Recklinghausen typ 1 (NF1) je autozomálně dominantně dědičné neurokutánní onemocnění, s incidencí 1:2500 – 3000 a vysokým výskytem nových mutací – 30 až 50% [1,2,3,4]. Diagnosa NF1 je definována na základě 7 diagnostických kritérii: 1) 6 a více skvrn café au lait na kůži, 2) freckling v inguinální nebo axilární oblasti, 3) 2 neurofibromy a/nebo 1 plexiformní neurofibrom, 4) Lischovy noduly, 5) gliom optiku, 6) kostní změny, 7) příbuzný prvního stupně. Ke stanovení diagnosy je potřeba nalézt alespoň 2 z těchto diagnostických kritérii [5]. Gen *NF1* se nachází na dlouhém raménku chromozomu 17 v oblasti 11.2 (17q11.2), patří mezi tumor-supresorové geny a jeho genový produkt neurofibromin se podílí na regulaci Ras-MAPK signální dráhy [4].

NF1 je onemocnění s multisystémovým postižením organismu a častým výskytem nádorů zejména centrálního i periferního nervového systému.

Nejčastějšími patologickými nálezy na MRI mozku jsou gliomy optiků, gliomy lokalizované mimo zrakovou dráhu a hypersignální ložiska v T2 vážených obrazech na MRI mozku (FASI = focal areas of signal intensity, nazývané také UBOs – unidentified bright objects či hamartomy). Dle současných znalostí jsou FASI ložiska způsobená aberatní myelinizací, nemají nádorový charakter a nezpůsobují ložiskovou symptomatiku [4,6,7].

Hydrocefalus se u NF1 pacientů objevuje buď sekundárně při expanzivním procesu mozku (nádor, arachnoidální cysta atd.) nebo při idiopatické stenose distální části akveduktu [1,2,7,8].

Kognitivní deficity patří mezi nejčastější komplikace NF1. Vývojové poruchy učení a/nebo chování se vyskytují u 50-60% dětí s NF1 [9]. Neverbální a verbální poruchy vývoje řeči jsou popisovány u 30-60% dětí s NF1, časté jsou poruchy jemné i hrubé motoriky [4].

Pacient č. 1

Chlapec je z neúplné rodiny (otec neznámý), matka bez známek NF1. Dítě z 1. fyziologické gravidity, porod ve 42. týdnu, indukovaný, porodní hmotnost, délka a poporodní adaptace byly v normě, pro ikterus měl krátce fototerapii. Skvrny café au lait byly patrné asi od 1 roku věku, psychomotorický vývoj byl od počátku nerovnoměrný a od batolecího věku byly pozorovány poruchy spánku. Ve 3 letech se objevil první epileptický záchvat s adverzí hlavy a očí doprava, hypersalivací, poruchou vědomí a následným zvracením. V místě bydliště byl nasazen fenytoin, který byl pro neúplnou kompenzaci záchvatů vyměněn za karbamazepin.

Ve věku pěti let byl pro mentální retardaci a epilepsii doporučen k první hospitalizaci na KDN FN Motol. V objektivním neurologickém nálezu byl výrazný psychomotorický neklid, mentální retardace, porucha vývoje řeči, konvergentní strabismus vlevo, hyperreflexie na pravostranných končetinách a skoliosa. Na kůži byly nalezeny skvrny café au lait (v diagnostickém počtu a velikosti pro NF1), nevýrazný inguinální freckling a 2 neurofibromy. Již dle kožního nálezu byla stanovena diagnosa NF1. Vyšetření očního pozadí bylo bez městnání, přední segment s nálezem Lischových nodulů. Na MRI mozku byl popsán gliom prechiasmatické části levého optiku, suspektní gliom pravého optiku a vícečetné FASI v typických lokalizacích. Komorový systém byl při tomto prvním MRI mozku štíhlý (obr.1). MRI míchy bylo v normě, bez nálezu paravertebrálních neurofibromů či durálních ektází. Vyšetření evokovaných potenciálů bylo s normálním nálezem latencí při vyšetření VEP i BAEP, ale amplituda odpovědi VEP, byla velmi vysoká (až 50uV). EEG bylo v širších mezích normy – jen s lehce abnormální základní aktivitou a episodami rytmických pomalých vln s pravostrannou převahou. Psycholog hodnotil PMV jako nerovnoměrný, opožděný do pásma středně těžké mentální retardace, s nejrozvinutější složkou hrubé motoriky.

V 7 letech věku se změnil charakter epileptických záchvatů, v neurologickém nálezu byla nově popsána (při porovnání s první hospitalizací) bilaterální lehká paresa n.VI. více vlevo a pyramidová iritace na levostranných končetinách. Přetrvávala porucha vývoje řeči, mentální retardace a skoliosa. Chlapec byl bez příznaků nitrolební hypertense. Na kontrolním MRI mozku byl nález dekompenzovaného supratentoriálního hydrocefalu na podkladě stenosis distální části akveduktu, bez ložiskových změn v okolí stenosis (obr.2). Ložiska FASI byly v typické lokalizaci a také gliomy obou optiků byly stacionární. Při akutní neurochirurgické operaci byl zaveden VP zkrat. Následně s odstupem 9 měsíců došlo k akutnímu zhoršení neurologického nálezu včetně zhoršení poruchy řeči. Na MRI mozku byla dekompenzace supratentoriálního hydrocefalu, ostatní nálezy byly stacionární.

Od neurochirurgické revize VP zkratu jsou opakované kontrolní MRI mozku se stacionárním nálezem (obr. 3) a ložiskový neurologický nález je dlouhodobě beze změny. Stále však dochází k pomalému zhoršování z hlediska mentálního - při kontrolním psychologickém vyšetření ve věku 12 let byl patrný regres, rozumové schopnosti hodnoceny v pásmu středně těžké mentální retardace s nejvýraznějším postižením mnestických funkcí, vývojová dysfázie a dysarthrie s dalším zhoršením kvality řeči. Chlapec je i nadále v našem sledování.

Byla provedena přímá DNA analýza genu NF1 s nálezem kauzální mutace v exonu 4c. Mutace typu missense c.647T>C způsobuje záměnu aminokyselinových zbytků v řetězci genomové DNA, p.Leu216Pro, a je pravděpodobnou příčinou vzniku nefunkčního genového produktu. Mutace byla prvně popsána Fasholdem [10], nikoliv však v souvislosti s podobným fenotypem pacienta.

Pacient č. 2

Dívka z 1. fyziologické gravidity, porod v termínu, bez komplikací, porodní váha, délka i poporodní adaptace byly v normě. Rodinná anamnesa je nevýznamná, bez příznaků NF1. Skvrny café au lait byly patrné od narození, psychomotorický vývoj byl až do 3 let věku v normě, včetně vývoje řeči. Od 4 let zhoršování kvality řeči, nejprve balbuties, postupně až rozvoj fatické poruchy se složkami expresivní afázie.

První hospitalizace na KDN FN Motol proběhla v 8 letech věku pro poruchu vývoje řeči a bolesti hlavy. V neurologickém nálezů byla makrocefalie, centrální paresa n.VII vpravo, lehká pravostranná zániková hemiparesa, výrazná neobratnost a porucha řeči. Na kůži byly nalezeny skvrny café au lait (v diagnostickém počtu a velikosti pro NF1), dále počínající axilární freckling a plexiformní neurofibrom na pravém předloktí. Již dle kožního nálezů byla stanovena diagnosa NF1. Oční pozadí bylo už při přijetí s nálezem měštnání vpravo a incipientním měštnáním vlevo. Na prvním MRI mozku byl nález supratentoriálního hydrocefalu s naznačeným přestupem moku do parenchymu, s nápadným zúžením terminální části dilatovaného mokovodu, bez ložiskových změn v okolí stenosis (obr. 4). Na MRI byly také popsány FASI supra i infratentoriálně a rozšíření obalů optických nervů oboustranně, bez známek gliomů optiku či chiasmatu. Stav byl řešen zavedením interventrikulostomie. Dále byla dívka ve stabilizovaném stavu, přechodně došlo i ke zlepšení řeči.

V 10 letech věku došlo opět ke zhoršení kvality řeči a zvýraznění únavnosti. Dále se začaly objevovat stavy s bolestí hlavy, nauzeou a zvracením, často s vegetativním doprovodem v obličeji (zarudnutí, pocení), které ustupovaly po vyspání. V aktuálním neurologickém

nálezu byla makrocefalie, blokáda C páteře, porucha statiky a dynamiky Th-L páteře, skoliosa, pyramidová iritace na dolních končetinách více vpravo a porucha řeči. Oční pozadí bylo bez měštnání, kontrolní MRI mozku bez známek dekompenzace hydrocefalu, bez nálezu expansivního procesu (obr. 5). EEG bylo lehce abnormální pro známky ospalosti a příměs pomalých vln bitemporálně s převahou vlevo, s negativní fotostimulací. Psycholog hodnotil dívku v pásmu lehké mentální retardace. Obtíže jsme uzavřeli jako migrenosní bolesti hlavy s podílem vertebrogenním.

Během dalšího sledování (do 19 let věku) nedošlo k dekompenzaci hydrocefalu ani ke vzniku nádoru mozku. I přes intenzivní logopedickou péči nedošlo ke zlepšení kvality řeči. Během dispenzarizace byla zjištěna hraniční hypertenze, byl vyloučen feochromocytom i cévní změny renálních artérií, medikace prozatím nebyla nasazena. Elektrofyzilogická vyšetření (evokované potenciály – VEP, BAEP) byly opakovaně v normě.

Mutační analýza genu NF1 odhalila v exonu 29 pravděpodobně kauzální mutaci typu delece, c.5220delT. Mutace vede k posunu čtecího rámce s následným vznikem terminačního kodonu, c.Ser1741Valfs3X. Předčasné ukončení translace proteinu směřuje k vytvoření zkráceného genového produktu, jehož funkce je tím omezena. Mutace byla prvně popsána v souvislosti s naším pacientem [11].

Diskuse

První zmínky o hydrocefalu na podkladě stenosis akveduktu jsou již z roku 1927 a 1940 [7,8]. Frekvence výskytu idiopatické stenosis akveduktu u pacientů s NF1 je 1.2 - 2% a ve většině případů je zjištěna během první, případně druhé dekády života [1,2,7,9,12]. U našich pacientů byla stenosa distální části akveduktu s rozvojem hydrocefalu nalezena v první dekádě života. U pacienta č. 1 došlo k rozvoji stenosis akveduktu a následného hydrocefalu v průběhu našeho sledování. Podobné pozorování jsme v literatuře nenalezli.

Hydrocefalus se u pacientů s NF1 vyskytuje v 1-4% [1,7]. Créange et al. [1] popisuje hydrocefalus u 7/158 (4%) NF1 pacientů (138 dospělých, 20 dětí), přičemž u dětí byl výskyt hydrocefalu častější (6/20) než v dospělosti (1/138). Hydrocefalus při stenose akveduktu popisuje Créange et al.[1] u 4 dětí ze sledované skupiny, z toho u jednoho pacienta byl hydrocefalus asymptomatický- bez příznaků nitrolební hypertense. U obou presentovaných pacientů byl syndrom nitrolební hypertense neúplně vyjádřen a rozvoj hydrocefalu dlouhodobě unikal pozornosti. Předpokládáme, že se na tom podílela pomalá progresse stenosis distální části akveduktu, s pozvolným nárůstem nitrolebního tlaku. Žádný z autorů neuvádí

jako komplikaci rozvoje hydrocefalu u pacientů s NF1 poruchu vývoje řeči nebo její regres. Obecně lze regres kvality řeči při dekompenzovaném hydrocefalu v některých případech očekávat. U prvního z našich pacientů byla porucha vývoje řeči patrná od počátku, tedy prokazatelně před rozvojem hydrocefalu. U druhé pacientky došlo ke zhoršení řeči ve 4 letech – předpokládáme, že také před rozvojem hydrocefalu, i když z tohoto období nemáme k dispozici zobrazení CNS, ale usuzujeme tak vzhledem k dlouhému, čtyřletému období bez dalších obtíží, které předcházelo manifestaci dekompenzovaného hydrocefalu. Po operačním řešení hydrocefalu u prvního pacienta nedošlo ke zlepšení řeči, u druhé pacientky jen k přechodnému mírnému zlepšení a během dalšího sledování kvalita řeči kolísala. Těžkou poruchu vývoje řeči proto u těchto pacientů nelze hodnotit jako následek hydrocefalu, ale jako další klinickou charakteristiku pacienta s NF1 a rozvojem stenosis distální části mokovodu. Přes značnou podobnost klinického obrazu jsou nalezené mutace NF1 genu odlišné.

Leisti [7] uvádí hypotézu o přímé expresi genu *NF1* v oblasti distální části akveduktu. Většina autorů [1-4,9,12] se k příčině stenosis nevyjadřuje a výše uvedenou hypotézu neuvádí. Příčinu rozvoje stenosis distální části akveduktu u NF1 tedy považujeme za toho času neobjasněnou.

Námi nalezené kauzální mutace jsou rozdílné povahy i lokalizace, nenacházejí se v žádné z doposud funkčně objasněných domén neurofibrominu. Jejich přesné působení na rozvoj onemocnění je neznámé.

Závěr

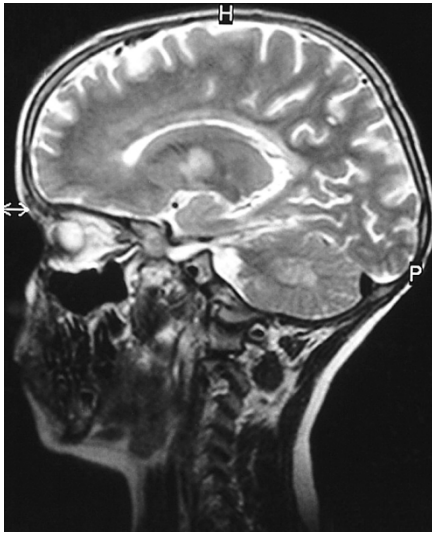
Hydrocefalus představuje závažnou až život ohrožující komplikaci diagnózy NF1 a s výskytem této komplikace je nutné počítat. Současný výskyt a /nebo vztah poruchy vývoje řeči a hydrocefalu při idiopatické stenosis akveduktu nebyl v literatuře dosud popsán. Na předkládaných kazuistikách dokládáme, že těžká porucha vývoje řeči může být jedním ze signálů pomalu se rozvíjející stenosis distální části akveduktu, která postupně vede k hydrocefalu. Těžká porucha vývoje řeči by měla být jednou z indikací k provedení zobrazení mozku u pacienta s NF1, nejlépe MRI mozku včetně MR PC (phase contrast) cine, což je vyšetření umožňující zobrazit průtok moku akveduktem.

Reference

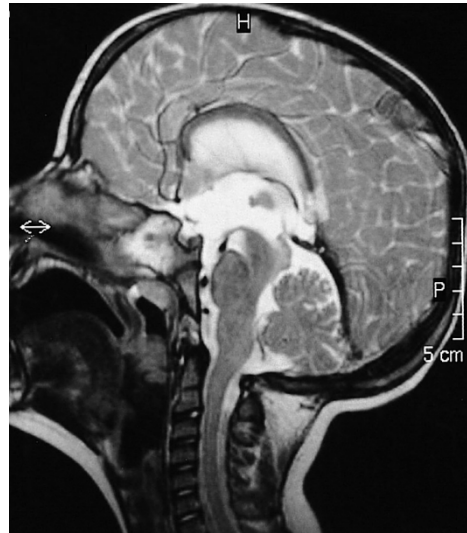
- 1) Créange A, Zeller J, Rostaing-Rigattieri S, Brugières P, Degos JD, Revuz J. Neurological complications of neurofibromatosis type 1 in adulthood. *Brain* 1999; 122(3): 473-481
- 2) Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *J Med Genet* 2007 ;44:81-88.
- 3) Riccardi VM. Neurofibromatosis: past, present, and future. *N Engl J Med* 1991; 324:1283-5.
- 4) Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL. Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *Pediatrics* 2009;123:124-133.
- 5) National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Neurofibromatosis. *Arch Neurol Chicago* 1988;45:575-8.
- 6) DiPaolo DP, Zimmerman RA, Rorke LB, Zackai EH, Bilaniuk LT, Yachnis AT. Neurofibromatosis Type 1: Pathologic Substrate of High-Signal-Intensity Foci in the Brain. *Radiology* 1995;195:721-724.
- 7) Leisti EL. Radiologic findings of the head and spine in neurofibromatosis 1 (NF1) in Northern Finland. Academic Dissertation, University of Oulu and Oulu University Hospital, Oulu 2003.
- 8) Horwitch A, Riccardi VM, Francke U. Brief clinical report: aqueductal stenosis leading to hydrocephalus – an unusual manifestation of neurofibromatosis. *Am J Med Genet* 1983; 14:577-581.
- 9) Riccardi VM. Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History, and Pathogenesis. 2nd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1992.
- 10) Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kucukceylan N et al. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet.* 2000; 66(3): 790-818.
- 11) Bendova S, Krepelova A, Petrak B, Kinstova L, Musova Z, Rausova E et al. Novel mutations in the NF1 gene in Czech patients with neurofibromatosis type 1. *J Mol Neurosci.* 2007; 31(3): 273-9.
- 12) Mc McGaughan JM, Harris DI, Donnai D, Teare D, MacLeod R, Westerbeek R et al. A clinical study of type 1 neurofibromatosis in north west England. *J Med Genet* 1999; 36:197-203.

Přílohy

Obrázek 1



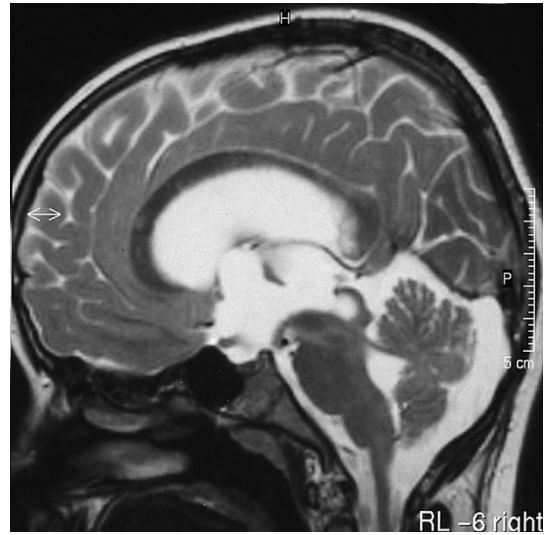
Obrázek 2



Obrázek 3



Obrázek 4



Obrázek 5



RNA-based mutational analysis of Czech patients suspected of NF1 as an efficient alternative for less sensitive DHPLC pre-screening

Bendova S. ^{1*}, Vasovcak P. ¹, Sedlacek Z. ¹, Marikova T. ¹, Kaluzova M. ², Petrak B. ², Krepelova A. ¹

¹Department of Biology and Medical Genetics, Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Department of Child Neurology, Charles University 2nd Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Keywords: Neurofibromatosis type 1, *NF1*, RNA-based analysis, mosaicism, parental age

* Corresponding author

Corresponding author:

Mgr. Sarka Bendova

Department of Biology and Medical Genetics,

Charles University 2nd Medical School and University Hospital Motol,

V Úvalu 84

150 06 Prague 5

Czech Republic

e-mail: bendova.s@email.cz

phone: 00 420/224 433 521

fax: 00 420/ 224 433 520

Abstract

Neurofibromatosis type 1 (NF1), a multisystem disorder with a high risk of tumours, is one of the most common autosomal dominant conditions worldwide. It is caused by mutations in the *NF1* gene, a large tumour suppressor gene encoding neurofibromin, a protein participating in the inactivation of the Ras pathway. The *NF1* gene shows one of the highest mutation rates among known human genes. Mutational analysis of *NF1* is complicated by its large size and complexity, absence of mutation hotspots and presence of several homologous pseudogene sequences in the genome. The implementation of RNA-based mutation analysis as an alternative for genomic DNA analysis using DHPLC showed to be more sensitive, specific, and time and cost effective. We report here the analysis of 44 patients suspected of NF1 from the Czech Republic using a combination of several molecular genetic methods.

Introduction

Neurofibromatosis type 1 (NF1; MIM# 162200) is one of the most common autosomal dominant disorders in man with incidence of 1 per 3500 births. Clinical management of patients with NF1 is complicated because of the diversity of clinical symptoms. The cardinal features of the disease are café-au-lait (CAL) spots, neurofibromas, freckling in the axillary or inguinal regions, Lisch nodules, optic nerve gliomas, bone dysplasias and an increased risk of malignant tumours (1). Approximately 50% of all NF1 cases are classified as sporadic. NF1 is caused by defects in the *NFI* gene which exhibits one of the highest mutation rates among human genes. *NFI* is a large and complex gene spanning 280 kb of genomic DNA on chromosome 17q11.2. It comprises 61 exons, of which at least 4 are alternatively spliced. The gene has a major transcript with an open reading frame of 8,454 nucleotides and encodes a GTPase activating protein, neurofibromin (2). The protein acts as a negative regulator of the Ras signalling pathway (3). Several tumours are associated with NF1, most frequently neurofibromas, optic pathway gliomas, pheochromocytomas or malignant peripheral nerve sheath tumours (1). A second hit in the wild type *NFI* allele is essential for tumour development (4).

Several different techniques have been applied for mutational analysis of the *NFI* gene (5-8). The large size and complexity of the gene, absence of mutation hotspots and presence of several homologous pseudogene sequences in the human genome make the mutational analysis difficult. Up to date, more than 1,280 different causal *NFI* mutations have been identified and listed in The Human Gene Mutation Database (HGMD) (9). To achieve a higher detection rate of the mutation screening we implemented an RNA-based assay. Compared to DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography), the assay used in our previous study (10), the RNA-based assay was in our hands more rapid, sensitive, specific and cost effective. This was in accord with the general notion that this approach is a powerful and effective means to identify germinal mutations, especially in large and complex genes expressed in easily accessible cell types such as lymphocytes (7, 8, 11, 12).

Patients and methods

In this study we analysed 44 Czech patients (14 familial and 30 sporadic) suspected of NF1. All patients signed an informed consent before the enrolment into the study. The diagnosis of NF1 was based on the NIH criteria and all patients fulfilled these criteria (13). DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using the Genomic DNA Purification Kit (Genra Systems, Minneapolis, MI, USA) according to manufacturer's instructions. The analysis of genomic DNA was performed using DHPLC on the WAVE DNA Fragment Analysis System and DNASep column with WAVE Optimized Buffers and Syringe Solution (all Transgenomic, Omaha, NE, USA). Primers used for the genomic DNA analysis were according to Han et al. (6). Heteroduplex formation was induced by PCR product denaturation at 95°C for 5 min followed by reannealing of the DNA strands at room temperature for 30 min (14). Conditions for an optimal heteroduplex separation were used as described previously (6). Samples with abnormal elution patterns were re-amplified, purified using the SureClean PCR Purification Kit (Bioline, London, UK), and sequenced in both directions using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit and ABI 3130 Genetic Analyzer (both Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

An RNA extraction was performed using PaxGene Blood RNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's guide. A reverse transcription of mRNA was accomplished in one step RT-PCR using SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The entire *NF1* cDNA was amplified in 20 overlapping PCR products which were sequenced using the same protocol as the one used for the genomic DNA PCR products. Primer sequences for cDNA amplification are available on request. All mutations detected at the cDNA level were verified in genomic DNA. The nomenclature of the mutations was based on the *NF1* mRNA reference sequence, GenBank NM_000267, and exons were numbered as recommended (6).

Patients with negative results of mutation testing were further examined using the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method with the SALSA MLPA KIT P081/P082 (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) to identify large exonic deletions or duplications. Array comparative genome hybridization (aCGH) was performed by Nimblegen on the chromosome 17 specific array HG18_CHR17_FT, and the results were analysed using SignalMap (Nimblegen, Madison, WI).

Results

Of the total of 44 NF1 patients, 29 were initially analysed using DHPLC, which revealed 10 of them to be carriers of pathogenic germline *NF1* mutations. Among the 19 patients negatively tested using DHPLC, MLPA revealed a multiexon deletion in one patient. This aberration was shown to be the recurrent 1.4 Mb long microdeletion removing *NF1* and adjacent genes (referred to as type I deletion (15)) using aCGH. Out of the 18 DHPLC- and MLPA-negative patients, 12 were analysed on the RNA level (in 6 patients RNA samples were not available), and this mutational analysis yielded 8 additional germline mutations.

A cohort of 15 new patients suspected of NF1, not analysed using DHPLC, was tested solely using the RNA-based analysis, and 14 of them were identified to carry a mutation. MLPA analysis excluded copy number changes in the sample from the single negatively tested patient. Overall, out of 27 patients, who underwent the RNA-based mutational analysis, 22 (78.6%) were positively tested for a *NF1* mutation (Table 1).

The 33 mutations identified in total among the 44 patients included 17 frameshift mutations (51.5% - 13 deletions, 2 duplications, 1 insertion and 1 indel), 7 nonsense mutations (20%), 7 splicing mutations (21.2%), 1 missense mutation predicted by Polyphen (16) to be pathogenic (3%) and 1 large deletion described above (3%). All 7 splicing mutations affected the canonical AG splice acceptor or GT splice donor sites. Three of them (c.3113+1G>T, c.3871-1G>A, and c.6858+2T>C) were characterised on the RNA level as well, and all caused skipping of the adjacent exons. To find out whether the mutations identified were novel or recurrent they were compared with the HGMD database (9). Fifteen mutations were described previously and 18 were novel (Table 1). The comparison of mutation spectra and clinical symptoms of the positively tested NF1 patients did not reveal any genotype-phenotype correlation.

Discussion

In this study, we examined a cohort of 44 NF1 patients for germline *NF1* mutations using different methods. Initially, 29 patients were screened using DHPLC and MLPA, an approach used in our previous study (10). The mutation detection rate in this group (37.9%) was lower compared to other reports using DNA based mutational analyses only (5, 6, 10, 17). The implementation of the RNA-based mutational analysis, which is more sensitive and effective, especially for large and complex genes like *NF1*, increased the mutation detection rate in this cohort of 29 patients to 65.5%. However, six of the 29 patients negatively tested using DHPLC and MLPA were not available for the RNA analysis. If we consider only patients tested on the RNA level, i. e. 12 patients from the first cohort of 29 (of whom 8 were detected to be mutated), and 15 patients from the second cohort analysed only on the RNA level (of whom 14 were mutation positive), the mutation detection rate reaches 81.5%. This rate is still lower compared to a study using a similar protocol (8) or another more extensive study (7), both with a 95% detection rate in patients fulfilling the NIH diagnostic criteria of NF1. One obvious explanation of the lower detection rate in the first cohort is that these patients were negatively tested using DHPLC, and this group might thus be enriched for patients with mutations which are difficult to identify or patients with no mutations at all. Other explanations may include phenocopies due to mutations in other genes or technical reasons. The preparation of cDNA included neither phytohaemagglutinin (PHA) treatment of lymphocytes to prevent illegitimate splicing (12) nor puromycin treatment to block nonsense mediated RNA decay (NMD) (7) which both could influence the mutation detection. The PAXgene RNA Blood Tubes used guarantee stabilization of RNA for up to 3 days at 18–25°C (18) and allow to skip both the PHA and puromycin treatment (8), but most of the samples analysed were sent from various regions of the country and could not be processed immediately. Although we did not observe any illegitimate splicing which could indicate aged blood (12) or problems with RNA stabilization, we cannot exclude the influence of prolonged storage of the material on the succeeding steps. The mutation detection rate can be especially vulnerable in case of mutations in mosaic state, where lower percentage of the mutated allele is usually present in lymphocytes (19), if ever. It could be hypothesised that such mutations, especially those undergoing NMD, might “disappear” in aged blood. There were 30 sporadic patients in our group (68.2%) and two of them showed somatic mosaicism that escaped detection using DHPLC. Because of the ~ 30-80% high frequency of sporadic cases (7, 8, 20) and somatic mosaicism (15, 21) in NF1, the analysis could be affected by this phenomenon.

Similarly, although rare or absent in NF1, balanced translocations (7) or epigenetic mechanisms such as *NF1* promoter hypermethylation (22, 23) could not be fully excluded as alternative causes of the lower mutation detection rate.

As to the mutation spectra, we observed a higher proportion of frameshift mutations (52% vs. 26%) and lower proportion of missense mutations (3% vs. 18%) compared to a large series of 1770 patients with *NF1* mutations (24). This difference could be explained by possible ethnic and geographical factors (25-27) or, more likely, by random fluctuation due to the small number of patients analysed. The rates of splicing and nonsense mutations, as well as copy number changes, were similar to published rates (24). A tendency towards a higher frequency of frameshift mutations was also noted in our previous study (10), even though missense mutations were more common compared to this report. Possible specificities in the mutational spectra need to be verified in a larger group of Czech NF1 patients.

There is an assumption that advanced parental age, especially that of the father is associated with higher occurrence of NF1 in progeny, at least in cohorts of sporadic cases (28, 29). Initial studies indicated that ~ 90% of sporadic *NF1* mutations arose on paternally derived alleles (30, 31), although the types of mutations were not analysed in these studies. Later on, Lazaro et al. proposed that ~ 80% of *NF1* mutations are of paternal origin, and that the mutation spectra in these cases include predominantly point substitutions or small frameshift (insertion or deletion) mutations (32). In contrast, large deletions involving the whole *NF1* gene were mainly of maternal origin (33). This phenomenon of sex bias in the mutational rate and mutational spectra was explained by different mechanisms acting during the development of germline cells in males and females (34). The mean maternal and paternal age at birth of our NF1 patients was 2.3 and 1.7 years higher, respectively, than that in the general population, and significantly increased parental age in a group of 103 Czech sporadic NF1 patients (including 20 patients from this study) was also shown by Snajderova et al. (35). Therefore we suppose that most of the mutations found in our cohort are of paternal origin and that they arose probably because of the higher age of the fathers.

High mutation rate in the *NF1* gene (33) may be responsible for the relatively high (although still underestimated) number of patients with somatic mosaicism. It has been presumed that early somatic mutations cause generalised disease while later mutations cause segmental NF1 (36). Both our patients with a mosaic of the *NF1* mutation had generalised manifestation of the disease and the only difference from other patients was the later onset of

CALs, which manifested after the first year of age. Unfortunately, we were not able to analyse the presence of somatic mutations in affected tissues of negatively tested patients, where the presence of somatic mosaicism could be verified.

Our initial experiences with RNA-based mutational analysis, together with the experience of others, led to the implementation of this approach as the first step in *NF1* mutational analysis and to complete omitting of the prescreening step using DHPLC. Only cases with no mutation identified by RNA testing are subjected to MLPA analysis. This approach showed to be more rapid, sensitive, specific and cost effective compared to any prescreening method. The method is particularly useful also for the study of effects of variants found in genomic DNA. The RNA-based analysis revealed that ~ 10% of mutations within *NF1* exons, classified at genomic DNA level as nonsense, missense or silent, affect correct splicing (24). Although we did not observe any such variants, the functional evaluation of “silent” and missense mutations of unknown significance is of crucial importance for future presymptomatic or predictive testing in families with such mutations.

Acknowledgements

We thank Veronika Obermajerova for performing the DNA isolation and Petra Hedvicakova for language correction. The work was supported by a grant MZ0FNM2005 from the Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- (1) Jett K, Friedman JM. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genet Med* 2010;12:1-11.
- (2) Horan MP, Osborn M, Cooper DN, Upadhyaya M. Functional analysis of polymorphic variation within the promoter and 5' untranslated region of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Am J Med Genet A* 2004;131:227-31.
- (3) Cui Y, Costa RM, Murphy GG, Elgersma Y, Zhu Y, Gutmann DH, et al. Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning. *Cell* 2008;135:549-60.
- (4) Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:820-3.
- (5) Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kucukceylan N, et al. Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. *Am J Hum Genet* 2000;66:790-818.
- (6) Han SS, Cooper DN, Upadhyaya MN. Evaluation of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the mutational analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *Hum Genet* 2001;109:487-97.
- (7) Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van RN, et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. *Hum Mutat* 2000;15:541-55.
- (8) Valero MC, Martin Y, Hernandez-Imaz E, Marina HA, Melean G, Valero AM, et al. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *J Mol Diagn* 2011;13:113-22.
- (9) The Human Mutation Database. <http://www.hgmd.org/> 2011.
- (10) Bendova S, Krepelova A, Petrak B, Kinstova L, Musova Z, Rausova E, et al. Novel mutations in the NF1 gene in Czech patients with neurofibromatosis type 1. *J Mol Neurosci* 2007;31:273-9.
- (11) Ars E, Serra E, Garcia J, Kruyer H, Gaona A, Lazaro C, et al. Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* 2000;9:237-47.
- (12) Wimmer K, Eckart M, Rehder H, Fonatsch C. Illegitimate splicing of the NF1 gene in healthy individuals mimics mutation-induced splicing alterations in NF1 patients. *Hum Genet* 2000;106:311-3.
- (13) Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol* 1988;45:575-8.

- (14) Kuklin A, Munson K, Gjerde D, Haefele R, Taylor P. Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system. *Genet Test* 1997;1:201-6.
- (15) Kehrer-Sawatzki H, Kluwe L, Sandig C, Kohn M, Wimmer K, Krammer U, et al. High frequency of mosaicism among patients with neurofibromatosis type 1 (NF1) with microdeletions caused by somatic recombination of the JJAZ1 gene. *Am J Hum Genet* 2004;75:410-23.
- (16) Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3894-900.
- (17) De Luca A., Buccino A, Gianni D, Mangino M, Giustini S, Richetta A, et al. NF1 gene analysis based on DHPLC. *Hum Mutat* 2003;21:171-2.
- (18) PAXgene™ Blood RNA Kit Handbook. <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/qiagen/1017455paxgenebloodrna42001.pdf> 2001.
- (19) Wimmer K, Yao S, Claes K, Kehrer-Sawatzki H, Tinschert S, De RT, et al. Spectrum of single- and multiexon NF1 copy number changes in a cohort of 1,100 unselected NF1 patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:265-76.
- (20) McGaughran JM, Harris DI, Donnai D, Teare D, MacLeod R, Westerbeek R, et al. A clinical study of type 1 neurofibromatosis in north west England. *J Med Genet* 1999;36:197-203.
- (21) Messiaen L, Vogt J, Bengesser K, Fu C, Mikhail F, Serra E, et al. Mosaic type-1 NF1 microdeletions as a cause of both generalized and segmental neurofibromatosis type-1 (NF1). *Hum Mutat* 2010.
- (22) Fishbein L, Eady B, Sanek N, Muir D, Wallace MR. Analysis of somatic NF1 promoter methylation in plexiform neurofibromas and Schwann cells. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;157:181-6.
- (23) Harder A, Rosche M, Reuss DE, Holtkamp N, Uhlmann K, Friedrich R, et al. Methylation analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) promoter in peripheral nerve sheath tumours. *Eur J Cancer* 2004;40:2820-8.
- (24) Messiaen L, Wimmer K. NF1 Mutational Spectrum. *Neurofibromatoses*. 2008. p. 63-77.
- (25) Jeong SY, Park SJ, Kim HJ. The spectrum of NF1 mutations in Korean patients with neurofibromatosis type 1. *J Korean Med Sci* 2006;21:107-12.
- (26) Lee MJ, Su YN, You HL, Chiou SC, Lin LC, Yang CC, et al. Identification of forty-five novel and twenty-three known NF1 mutations in Chinese patients with neurofibromatosis type 1. *Hum Mutat* 2006;27:832.
- (27) Mattocks C, Baralle D, Tarpey P, French-Constant C, Bobrow M, Whittaker J. Automated comparative sequence analysis identifies mutations in 89% of NF1 patients and confirms a mutation cluster in exons 11-17 distinct from the GAP related domain. *J Med Genet* 2004;41:e48.

- (28) Poyhonen M, Kytola S, Leisti J. Epidemiology of neurofibromatosis type 1 (NF1) in northern Finland. *J Med Genet* 2000;37:632-6.
- (29) Riccardi VM, Dobson CE, Chakraborty R, Bontke C. The pathophysiology of neurofibromatosis: IX. Paternal age as a factor in the origin of new mutations. *Am J Med Genet* 1984;18:169-76.
- (30) Jadayel D, Fain P, Upadhyaya M, Ponder MA, Huson SM, Carey J, et al. Paternal origin of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Nature* 1990;343:558-9.
- (31) Stephens K, Kayes L, Riccardi VM, Rising M, Sybert VP, Pagon RA. Preferential mutation of the neurofibromatosis type 1 gene in paternally derived chromosomes. *Hum Genet* 1992;88:279-82.
- (32) Lazaro C, Gaona A, Ainsworth P, Tenconi R, Vidaud D, Kruyer H, et al. Sex differences in mutational rate and mutational mechanism in the NF1 gene in neurofibromatosis type 1 patients. *Hum Genet* 1996;98:696-9.
- (33) Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, Osborn M, Hartog C, Mudd S, et al. Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Hum Genet* 1998;102:591-7.
- (34) Crow JF. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet* 2000;1:40-7.
- (35) Snajderova M, Riccardi V, Petrak B, Zemkova D, Zapletalova J, Mardesic T, et al. The Importance of Advanced Parental Age in th Origin of Neurofibromatosis Type 1. *Am J Med Genet A*. 2012 Epub ahead of print.
- (36) Kehrer-Sawatzki H, Cooper DN. Mosaicism in sporadic neurofibromatosis type 1: variations on a theme common to other hereditary cancer syndromes? *J Med Genet* 2008;45:622-31.

Table 1. Summary of mutations detected in the *NF1* gene.

Case	Family history	Method	Nucleotide change	Germinal mutation		Reference
				mRNA level	Protein level	
79	-	DHPLC MLPA	n.p.	c.4737delA		p.Ala1580Leufs*23 novel
72	+	DHPLC MLPA	n.p.	c.2446C>T		p.Arg816* Maynard 1997
71	+	DHPLC MLPA	n.p.	c.5749+2T>G		n.a. Purandare 1994
17S	-	DHPLC MLPA	n.p.	c.147C>G		p.Tyr49* Fahsold 2000
13S	-	DHPLC MLPA	n.p.	c.1185+1G>A		n.a. novel
86	-	DHPLC MLPA	n.p.	c.2850+1G>T		n.a. novel
75	-	DHPLC MLPA	n.p.	c.2902insA		p.Met968Asnfs*2 novel
87	-	DHPLC MLPA	n.p.	c.6641+1G>A		n.a. De Luca 2004
14S	+	DHPLC MLPA	n.p.	c.7166delT		p.Val 2389Alafs*8 novel
84	+	DHPLC MLPA	n.p.	c.7192_c.7193delCT		p.Leu2398Valfs*2 Orione 2002
18S	-	DHPLC MLPA, aCGH	n.p.	1.4 Mb del		DeRaedt 2004
91	-	DHPLC MLPA	n.p.			
2S	-	DHPLC MLPA	n.p.			
11S	-	DHPLC MLPA	n.p.			
16S	-	DHPLC MLPA	n.p.			
81	-	DHPLC MLPA	n.p.			
83	-	DHPLC MLPA	n.p.			
17R	+	DHPLC MLPA	mRNA	c.3113+1G>T	r.2991_3113del	p.Tyr998_Arg1038del Ars 2003
15R#	-	DHPLC MLPA	mRNA	c.[=/1021_1022delGT]	r.[=/1021_1022delgu]	p.[=/Val341Hisfs*11] De Luca 2004
18R#	-	DHPLC MLPA	mRNA	c.[=/3047_3048delGT]	r.[=/3047_3048delgu]	p.[=/Cys1916Serfs*4] novel
6R	-	DHPLC MLPA	mRNA	c.3739_3742delTTTG	r.3739_3742deluuug	p.Phe1247Ilefs*18 novel
23R	+	DHPLC MLPA	mRNA	c.4288A>T	r.4288a>u	p.Asn1430Tyr De Luca 2005
19R	-	DHPLC MLPA	mRNA	c.5060dupT	r.5060dupu	p.Ile1688Hisfs*9 novel
16R	-	DHPLC MLPA	mRNA	c.6291_6309dup13	r.6291_6309dup13	p.Leu2104* novel
24R	-	DHPLC MLPA	mRNA	c.7486C>T	r.7486c>u	p.Arg2496* Purandare 1994
20R	-	DHPLC MLPA	mRNA			
12R	+	DHPLC MLPA	mRNA			
22R	-	DHPLC MLPA	mRNA			
25R	-	DHPLC MLPA	mRNA			
26R	-	n.p.	n.p.	mRNA c.40_41delGT	r.40_41delgu	p.Val14Glnfs*23 novel
29R	+	n.p.	n.p.	mRNA c.1699_1710delinsC	r.1699_1710delinsc	p.Val567Leufs*4 novel
30R	-	n.p.	n.p.	mRNA c.1147delT	r.1147delu	p.Cys383Alafs*4 novel
9R	+	n.p.	n.p.	mRNA c.1318C>T	r.1318c>u	p.Arg440* Heim 1995
1R	-	n.p.	n.p.	mRNA c.1756_1759delACTA	r.1756_1759delacua	p.Thr586Valfs*18 Park 1998
5R	+	n.p.	n.p.	mRNA c.2218G>T	r.2218g>u	p.Glu740* novel
11R	+	n.p.	n.p.	mRNA c.3871-1G>A	r.3871_3974del	p.Arg1325Valfs*8 Ars 2000
4R	-	n.p.	n.p.	mRNA c.4250delG	r.4250delg	p.Gly1417 Val fs* 2 novel
3R	+	n.p.	n.p.	mRNA c.5242C>T	r.5242c>u	p.Arg1748* Valero 1994
8R	+	n.p.	n.p.	mRNA c.5627delG	r.5627delg	p.Gly1876Valfs*28 novel
13R	-	n.p.	n.p.	mRNA c.5867delA	r.5867dela	p.Lys1956Serfs*2 Ayter 2006
10R	-	n.p.	n.p.	mRNA c.6858+2T>C	r.6757_6858del	p.Ala2253_Lys2286del novel
2R	-	n.p.	n.p.	mRNA c.7446C>A	r.7446c>a	p.Tyr2482* novel
7R	+	n.p.	n.p.	mRNA c.8037delA	r.8037dela	p.Ser2680Leufs*38 novel
21R	-	n.p.	MLPA	mRNA		

Legend: +, familial; -, sporadic; n.p., not performed; n.a., not analysed; #, mosaic state; ?, unknown.