



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Moleculair-genetische aspecten van neurofibromatosis

Hulsebos, T.J.M.

Publication date
1997

Published in
Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Hulsebos, T. J. M. (1997). Moleculair-genetische aspecten van neurofibromatosis. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 141, 620-623.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Moleculair-genetische aspecten van neurofibromatosis

T.J.M.HULSEBOS

In 1989 gaf Fleury in dit tijdschrift een overzicht van de op dat moment aanwezige kennis betreffende de klinische en genetische aspecten van neurofibromatosis.¹ Toen reeds was duidelijk dat neurofibromatosis, gekenmerkt door een predispositie tot het krijgen van tumoren van het zenuwstelsel, meerdere erfelijke aandoeningen omvat. Het gen voor de meest voorkomende vorm, neurofibromatosis type 1 (NF1) of neurofibromatosis van Von Recklinghausen, was op de lange arm van chromosoom 17 gelokaliseerd. Het gen voor een andere, veel minder frequente vorm, neurofibromatosis type 2 (NF2) of bilaterale acusticus-neurofibromatosis, bleek op chromosoom 22 gelegen te zijn. Daarnaast waren nog andere NF-vormen bekend, waarvan niet duidelijk was of dit varianten waren van NF1 of NF2 of genetisch separate aandoeningen. Sindsdien is onze kennis van met name de moleculair-genetische aspecten van NF1 en NF2 spectaculair toegenomen: het NF1- en het NF2-gen zijn geïdentificeerd, de eiwitten waarvoor deze genen coderen, zijn bekend en hun functies worden intensief bestudeerd. Bovendien blijken beide genen tot de groep van tumorsuppressorgenen te behoren; inactivering van deze genen, door mutatie of deletie, heeft ongecontroleerde celdeling en daardoor tumorvorming tot gevolg.

NEUROFIBROMATOSIS TYPE 1

NF1 is een frequente, autosomaal dominant overervende aandoening; de frequentie bedraagt 1 per 3000 geboorten.² De ziekte wordt gekenmerkt door het voorkomen van neurofibromen, café-au-laitvlekken, irishamartomen (zogenaamde Lisch-noduli), N.-opticusgliomen en velerlei ontwikkelingsstoornissen. De klinische en DNA-diagnostische aspecten van NF1 worden elders in dit tijdschriftnummer behandeld.³ Met behulp van zogenaamd koppelingsonderzoek (onderzoek waarbij wordt vastgesteld welk chromosoom(gedeelte) tezamen met de aandoening wordt overgeërfd) was het gebied op de lange arm van chromosoom 17, waarin het NF1-gen zou moeten liggen, ingeperkt tot enkele miljoenen baseparen. Hierin 'passen' nog zeker enkele tientallen genen van gemiddelde grootte en welke van deze zou dan het NF1-gen zijn?

De identificatie van het NF1-gen werd mogelijk door het bekend worden van twee NF1-patiënten met zogenaamde gerearrangeerde chromosomen. Normaliter worden bij NF1-patiënten geen structurele chromosomale afwijkingen gevonden, dat wil zeggen afwijkingen in chromosoomaantal of -vorm. Echter, bij deze patiën-

Zie ook de artikelen op bl. 624 en 639.

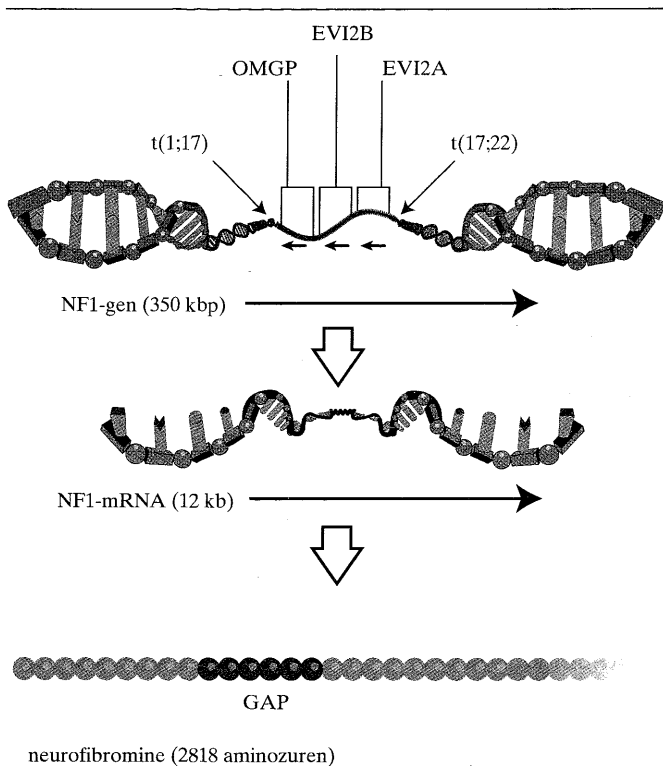
SAMENVATTING

- Twee vormen van neurofibromatose, type 1 (NF1) en type 2 (NF2), houden verband met genen gelokaliseerd op respectievelijk chromosoom 17 en 22.
- De genen die bij neurofibromatose geïnactiveerd zijn, coderen voor respectievelijk het eiwit neurofibromine en merline. Omdat inactivering leidt tot tumorziekte worden ze tumorsuppressorgenen genoemd.
- Neurofibromine heeft overeenkomsten met eiwitten die zorgen voor de inactivering van oncogenen. Merline vertoont verwantschap met eiwitten die het cytoskelet en de celmembraan met elkaar verbinden. De precieze functie van de eiwitten is nog onbekend.
- Het NF1-gen wordt gekenmerkt door uitzonderlijk grote gevoeligheid voor mutatie; de helft van de NF1-patiënten heeft de ziekte niet door overerving.
- Bij de familiale vorm van neurofibromatose wordt een gemuteerd gen overgeërfd en wordt het normale allel in de tumor geïnactiveerd waardoor tumoruitgroei kan plaatsvinden. Bij de sporadische vorm van neurofibromatose worden beide normale allelen lokaal in het weefsel geïnactiveerd zodat ter plaatse een tumor ontstaat.

ten werden gebalanceerde translocaties aangetroffen (tussen de chromosomen 1 en 17 en tussen 17 en 22; gebalanceerd wil zeggen dat bij de translocatie geen chromosoommateriaal is verloren gegaan). In beide gevallen lagen de translocatie-breukpunten in de regio op chromosoom 17 waarin het NF1-gen werd vermoed. Door de translocatie zou een breuk in het NF1-gen zijn opgetreden, waardoor het NF1-gen niet meer zijn normale functie zou kunnen uitoefenen. Dit bleek inderdaad het geval. De breukpunten werden gekloneerd en bleken slechts ongeveer 60 kbp (van 'kilobaseparen', 1 kbp is 1000 baseparen) van elkaar verwijderd te liggen. Toch heeft het nog heel veel moeite gekost om het NF1-gen te identificeren.^{4,5}

Neurofibromine. Het NF1-gen is ongeveer 350 kbp groot (figuur 1). Het bevat 59 exonen, die coderen voor een messenger-RNA (mRNA) met een lengte van ongeveer 12 kb (kilobasen). Dit RNA wordt vertaald in een zeer groot eiwit, genaamd neurofibromine, met een lengte van 2818 aminozuren. Het grootste gedeelte van het gen bestaat uit intronen, dit zijn niet-coderende regio's, die na transcriptie uit het RNA worden verwijderd. De beide translocatiebreukpunten liggen in respectievelijk intron 27b en intron 31 van het NF1-gen.⁶ Volkomen onverwacht werden tussen deze breukpunten (in intron 27b) nog 3 andere genen gevonden (OMGP, EVI2B en EVI2A), die in omgekeerde richting worden

Academisch Medisch Centrum, Instituut voor Antropogenetica, Meibergdreef 15, 1105 AZ Amsterdam.
Dr.T.J.M.Hulsebos, moleculair bioloog.



FIGUUR 1. Structuur en expressie van het gen van neurofibromatose type 1 (NF1) op chromosoom 17. Het NF1-gen bevat 59 exonen (regio's die de genetische code voor eiwitten bevatten), met daartussen intronen (niet-coderende regio's), die verspreid liggen over een gebied van 350 kilobaseparen (kbp). De globale posities van de beide translocatie-breukpunten ($t(1;17)$ en $t(17;22)$) en van de 3 genen in intron 27b (OMGP, EVI2B en EVI2A) zijn aangegeven. De richting waarin het NF1-gen wordt afgelezen (transcriptie) met als resultaat een 'messenger'-RNA-keten is met een grote horizontale pijl naar rechts aangegeven. Na transcriptie worden de intronen uit het RNA verwijderd en de exon-bevattende delen aan elkaar gezet. Dit proces wordt 'splicing' genoemd. Het rijpe mRNA, met een lengte van ongeveer 12 kilobasen (kb), codeert voor neurofibromine. Aangegeven is het deel van neurofibromine dat grote overeenkomst in aminozuurvolgorde vertoont met guanidintrifosfatase-activerende proteïnen (GAP-eiwitten). (Illustratie: R.P.Slagter.)

getranscribeerd. Deze genen zijn ook weer opgebouwd uit exonen en intronen. Hun relatie tot NF1 is vooralsnog onduidelijk.

Verband met oncogenen. Het middendeel van het neurofibromine heeft een aminozuurvolgorde die grote overeenkomst vertoont met die van guanidintrifosfatase-activerende proteïnen (GAP's). Dit zijn eiwitten die betrokken zijn bij de omzetting van het proto-oncogen *p21-ras* van een actieve guanidintrifosfaat (GTP)-gebonden vorm in een inactieve guanidinedifosfaat (GDP)-gebonden vorm. Het *p21-ras* behoort tot de zogenaamde oncogenen. Dit zijn genen die onder normale omstandigheden (als proto-oncogen) een functie hebben in de regulatie van cellulaire processen, zoals celdeling en differentiatie. Als ze echter blijvend geactiveerd zijn (men spreekt dan van een oncogen) dan heeft dat tumorvorming tot gevolg.

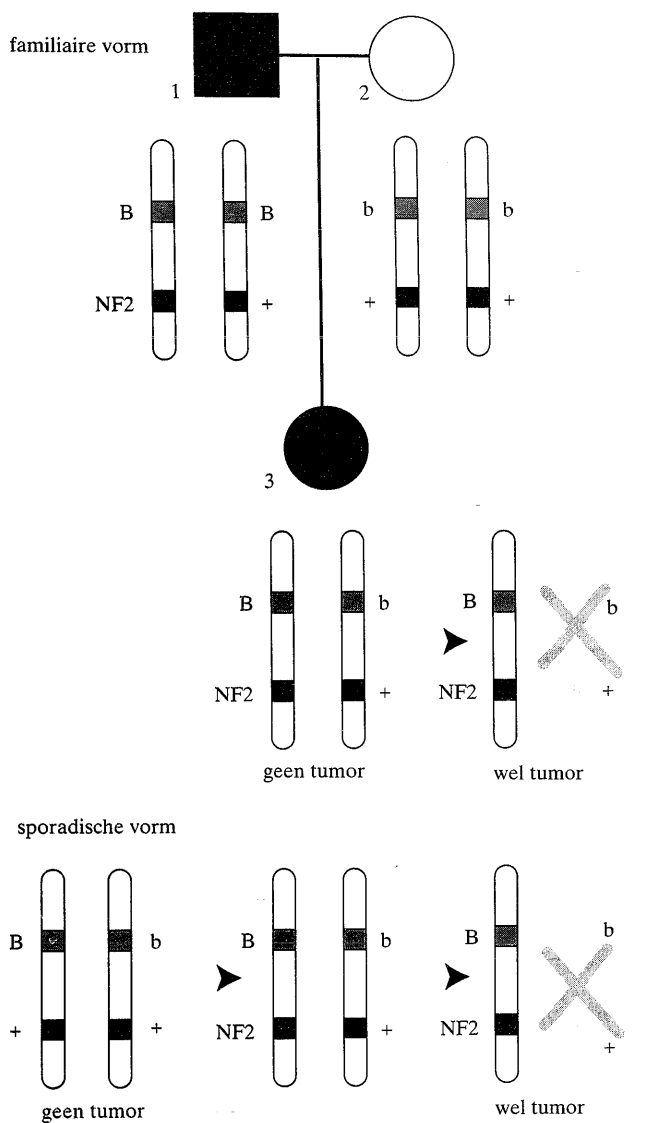
Een mogelijke werking van neurofibromine is als volgt: neurofibromine onderdrukt de oncogene werking van *p21-ras* door stimulering van de omzetting van het actieve *p21-ras*-GTP in het inactieve *p21-ras*-GDP. In een tumor waarin beide kopieën van het NF1-gen geïnactiveerd zijn, wordt geen neurofibromine meer gemaakt. Hierdoor blijft het *p21-ras* in de actieve vorm en wordt de tumorvorming gestimuleerd. Onder normale omstandigheden onderdrukt neurofibromine dus tumorvorming. Het NF1-gen, dat codeert voor dit eiwit, wordt dan ook een tumorsuppressorgen genoemd (zie verder).

NEUROFIBROMATOSIS TYPE 2

NF2 is een zeldzame autosomaal dominant overervende aandoening (de frequentie is 1 per 40000 geboorten).² Het belangrijkste kenmerk van de aandoening is de ontwikkeling van bilaterale vestibulaire schwannomen op jong-volwassen leeftijd. Daarnaast worden met name meningiomen, maar ook ependymomen en astrocytomen, in verhoogde frequentie bij personen met NF2 aangetroffen. Door koppelingsstudies was het NF2-gen op chromosoom 22 geplaatst. De inperking van de regio op chromosoom 22, waar het NF2-gen zou moeten liggen, is vooral tot stand gekomen door de moleculair-genetische analyse van NF2-specifieke tumoren. Er werd namelijk verondersteld dat het NF2-gen een tumorsuppressorgen zou kunnen zijn. Zoals reeds vermeld in de vorige paragraaf, is dit een gen waarvan uitschakeling van beide kopieën resulteert in tumorvorming. Deze zogenaamde 'two-hit'-hypothese is voor het eerst geformuleerd door Knudson⁷ om de vorming van retinoblastoma, een erfelijke tumor van de retina, te verklaren.

'Two-hit'-mechanisme. Toegepast op NF2 komt deze hypothese op het volgende neer (figuur 2). Bij de getroffen vader is één kopie van het NF2-gen in alle lichaamscellen geïnactiveerd door een (meestal kleine) mutatie. Dit gemuteerde NF2-gen heeft hij doorgegeven aan zijn dochter, waardoor ook al haar lichaamscellen de mutatie bevatten. De dochter heeft nog een tweede, normaal werkend NF2-gen, dat afkomstig is van de moeder. De inactiverende mutatie van dit gen vindt plaats in het weefsel waarin de tumor ontstaat. Vaak betreft deze mutatie een deletie van het gehele chromosoom 22 of van een gedeelte daarvan met daarop het tweede nog intacte NF2-gen. Het resultaat is dat beide kopieën van het NF2-gen geïnactiveerd zijn, waardoor tumorvorming plaats kan vinden. Indien een DNA-marker in de regio ligt die betrokken is bij de deletie, dan kan deze NF2-gen-inactivering moleculair-genetisch vastgesteld worden omdat dan één allel van de DNA-marker verloren gaat (allel b in figuur 2). Door nu in een groot aantal schwannomen de DNA-markers op chromosoom 22 te testen op allelverlies, kon een kleine regio worden aangewezen, die altijd verloren ging in de tumor. Op deze manier kon de regio op chromosoom 22 waarin het NF2-gen moest liggen sterk ingeperkt worden.⁸

Voor dit onderzoek konden ook sporadische schwannomen, dus van patiënten zonder NF2, worden gebruikt omdat ook deze tumoren volgens het two-hitmechanis-



FIGUUR 2. Het tumorsuppressorgenmodel voor neurofibromatose type 2 (NF2). Bovenaan is een klein stukje stamboom weergegeven met een getroffen vader (1) en een niet-getroffen moeder (2). De beide chromosomen 22 zijn bij de personen aangegeven. De dochter (3) heeft van haar moeder een normaal werkend NF2-gen geërfd (+), van haar vader een gemuteerd NF2-gen (NF2). De mutatie is dus aanwezig in al haar lichaamscellen. Schwannoomvorming vindt plaats doordat het normaal werkende NF2-gen verloren is gegaan door deletie van chromosoom 22 (of van een deel daarvan) in de Schwann-cel. In de sporadische vorm vinden mutatie en deletie beide in de Schwann-cel plaats. Op de chromosomen ligt een allel (B of b) van een DNA-marker in de buurt van het NF2-gen. Door de deletie van chromosoom 22 is het allel b van een DNA-marker verdwenen. Dit allelverlies kan met moleculair-biologische middelen worden vastgesteld. Omgekeerd is een dergelijk allelverlies in de tumor een indicatie voor de aanwezigheid van een tumorsuppressorgen in de buurt van de onderzochte DNA-marker. (Illustratie: R.P.Slagter.)

me ontstaan. Beide inactiverende mutaties vinden dan echter in het weefsel plaats waaruit de tumor ontstaat (zie figuur 2).

De uiteindelijke identificatie van het NF2-gen werd mogelijk door de analyse van het DNA van NF2-patiën-

ten met een kleine deletie in de ingeperkte regio op chromosoom 22. Door deze deleties zou het NF2-gen verloren kunnen zijn gegaan. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Het NF2-gen is ongeveer 100 kbp groot. Het bevat 17 exonen, die coderen voor een mRNA met een lengte van 4500 basen. Het RNA wordt vertaald in een eiwit, genaamd merline⁹ of schwannomine,¹⁰ met een lengte van 595 aminozuren. Dit eiwit vertoont verwantschap met eiwitten die het cytoskelet en de celmembraan met elkaar verbinden. Hoe het eiwit zijn tumoronderdrukkende werking uitoefent, is onderwerp van intensief onderzoek.

TUMORSUPPRESSORGENEN

Als het NF1- en het NF2-gen tumorsuppressorgenen zijn, dan moeten dus beide kopieën van de respectievelijke genen geïnactiveerd zijn in NF1- of NF2-specifieke tumoren. Voor zowel schwannomen¹¹ als meningiomen¹² is aangetoond dat dit inderdaad vaak het geval is. Onlangs is gerapporteerd dat in neurofibromen, die karakteristiek zijn voor NF1, deleties van het NF1-gen voorkomen.¹³ Slechts in één geval heeft men nu kunnen laten zien dat beide kopieën van het NF1-gen geïnactiveerd waren in een tumor; het betrof een neurofibroom van een NF1-patiënt. Een complete kopie van het NF1-gen was verloren gegaan door deletie. In de andere kopie was een kleine deletie aanwezig, die resulteerde in de vorming van een inactief eiwit.¹⁴

MUISMODELLEN

Het onderzoek van humane genen en de eiwitten waarvoor ze coderen, wordt beperkt door de geringe mogelijkheden van experimenteel onderzoek. Belangrijke genen zijn echter vrijwel altijd evolutionair geconserveerd, wat wil zeggen dat ze ook bij andere species voorkomen. De muis is reeds vele jaren het onderwerp van genetisch en moleculair-biologisch onderzoek. Er zijn nu technieken beschikbaar om genen bij de muis gericht uit te schakelen om zodoende hun functie te kunnen bestuderen. Muizen met één geïnactiveerd NF1-gen, overeenkomstig de situatie bij NF1-patiënten, krijgen echter niet de typische humane NF1-kenmerken, zoals neurofibromen, café-au-laitvlekken of irishamartomen.^{15 16} In dit opzicht is de muis dus niet het ideale diervorm. Wel zijn deze muizen veel gevoeliger voor het krijgen van tumoren (met name feochromocytomen) en van leukemie. Beide laatste aandoeningen komen ook in verhoogde frequentie bij NF1-patiënten voor. Muizen waarbij beide NF1-genkopieën zijn geïnactiveerd, zijn niet levensvatbaar. Ze sterven voor de geboorte als gevolg van ernstige ontwikkelingsstoornissen van het hart. Uit deze resultaten blijkt dat het NF1-gen een belangrijke functie vervult gedurende de normale ontwikkeling. Aan een muismodel voor NF2 wordt op dit moment op verschillende onderzoeksinstituten gewerkt.

TOEKOMST

Het NF1-gen wordt gekenmerkt door een uitzonderlijk hoge mutatiegevoeligheid. Bij de helft van de NF1-patiënten is de aandoening het gevolg van een nieuwe mu-

tatie, met andere woorden: de patiënt heeft geen getroffen ouder. Naar de oorzaak van deze mutatiegevoeligheid wordt veel onderzoek verricht. Een ander kenmerk van NF1 is de grote variabiliteit in de klinische manifestatie van de aandoening. Binnen één familie kunnen sommige dragers van het gemuteerde NF1-gen ernstig getroffen zijn, terwijl andere gendragers nauwelijks klinische verschijnselen vertonen. Misschien zijn er modifierende genen die de expressie van het NF1-gen beïnvloeden. Wellicht zijn ook niet-genetische factoren van belang. De ernst van de aandoening kan dus op dit moment bij gendragers niet worden voorspeld.

Voor NF2 is gebleken dat bij ongeveer de helft van de getroffen personen de oorzakelijke mutatie in het NF2-gen aangetoond kan worden. Waarom bij de overige helft de mutatie niet gevonden kon worden, is onderwerp van onderzoek. Ook bij NF2 is sprake van een grote klinische variabiliteit in de manifestatie van de aandoening. Deze variabiliteit is echter vooral interfamiliair. Binnen een familie is dit veel minder het geval. Momenteel wordt getracht te achterhalen of er een correlatie bestaat tussen aard en positie van de mutatie in het NF2-gen en de ernst van de aandoening.

Het is duidelijk dat zowel het NF1- als het NF2-gen een belangrijke rol speelt gedurende de normale ontwikkeling. Wat precies de functie is van de eiwitten en hoe die functie ontregeld raakt door mutaties in de respectievelijke genen is onderwerp van intensief onderzoek. Kennis van deze aspecten is een noodzakelijke voorwaarde om te komen tot de ontwikkeling van therapeutische systemen, waarmee gericht gedereguleerde groei bij NF1- en NF2-patiënten bestreden kan worden.

ABSTRACT

Molecular-genetic aspects of neurofibromatosis

– Two forms of neurofibromatosis, type 1 (NF1) and type 2 (NF2) are connected with genes localized on chromosomes 17 and 22, respectively.

– The genes that are inactivated in neurofibromatosis code for the proteins neurofibromine and merline, respectively. Since inactivation leads to neoplasia, they are called tumour suppressor genes.

– Neurofibromine shows resemblances to proteins that serve to inactivate oncogenes. Merline has a relationship with proteins that connect the cytoskeleton and the cell membrane. The precise function of the proteins is still unknown.

– The NF1 gene is characterized by extraordinarily high sensitivity to mutation; half the NF1 patients have not inherited the disease.

– In the familial form of neurofibromatosis, a mutated gene is inherited and the normal allele in the tumour is inactivated, making tumour growth possible. In the sporadic form of neurofibromatosis, both normal alleles are inactivated locally in the tissue so that a tumour develops in that place.

LITERATUUR

- 1 Fleury P. Neurofibromatosis; genetische en klinische aspecten. Ned Tijdschr Geneesk 1989;133:2279-83.
- 2 Huson SM, Hughes RAC. The neurofibromatoses: a pathogenetic and clinical overview. London: Chapman and Hall, 1994.

- 3 Overweg-Plandsoen WCG, Weersink RGM, Sillevius Smitt JH, Fleury P, Asperen CJ van. Neurofibromatosis type 1: een overzicht van 196 patiënten. Ned Tijdschr Geneesk 1997;141:624-9.
- 4 Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. Cell 1990;62:187-92.
- 5 Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. Science 1990;249:181-6.
- 6 Li Y, O'Connell P, Breidenbach HH, Cawthon R, Stevens J, Xu G, et al. Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). Genomics 1995;25:9-18.
- 7 Knudson jr AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1971;68:820-3.
- 8 Bijlsma EK, Brouwer-Mladin R, Bosch DA, Westerveld A, Hulsebos TJM. Molecular characterization of chromosome 22 deletions in schwannomas. Genes Chromosomes Cancer 1992;5:201-5.
- 9 Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, et al. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. Cell 1993;72:791-800.
- 10 Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. Nature 1993;363:515-21.
- 11 Bijlsma EK, Merel P, Bosch DA, Westerveld A, Delattre O, Thomas G, et al. Analysis of mutations in the SCH gene in schwannomas. Genes Chromosomes Cancer 1994;11:7-14.
- 12 Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA, Seizinger BR, Hagemeyer A, Drunen E van, et al. Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. Am J Hum Genet 1994;54:1022-9.
- 13 Colman SD, Williams CA, Wallace MR. Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. Nat Genet 1995;11:90-2.
- 14 Sawada S, Florell S, Purandere SM, Ota M, Stephens K, Viskochil D. Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma. Nat Genet 1996;14:110-2.
- 15 Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, Weinberg RA. Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. Nat Genet 1994;7:353-61.
- 16 Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, et al. Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. Genes Dev 1994;8:1019-29.

Aanvaard op 27 juni 1996

Bladvulling

Spionnen in de achterbuurt

Er zijn zulke gewichtige en bedroevende verschijnselen in onze negentiende eeuwse maatschappij waar te nemen, die naar mijn vaste overtuiging berusten op de geringe bekendheid van den eenen stand met den anderen. Het is zelfs zoover gekomen, dat een beschaafd man en een beschaafde vrouw zich hebben vermomd om, onder den schijn van tot de hinnen te behooren, het leven der fabrieksarbeiders en arbeidsters te bestudeeren. Alsof zij spionnen waren in een vijandelijk land moesten zij kennis maken met hun eigen landgenooten, zorgende hun waren stand niet te verraden, op straffe van onmiddellijk gewantwoord te worden en het open en vrije woord te zien besterven op de lippen hunner medemenschen, wier lijden zij wilden verzachten door het bekend te maken, wier streven naar een beteren toestand zij wilden ondersteunen.

(Ned Tijdschr Geneesk 1897;41II:46.)