

Fakomatozy – znaczenie badań genetycznych dla personalizacji postępowania klinicznego (część 1.)

Anna Kofla-Dłubacz¹, Andrzej Stawarski¹, Tomasz Pytrus¹, Justyna Gil²

¹II Katedra i Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław

²Katedra i Zakład Genetyki, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław

Genetycznie uwarunkowane zaburzenia rozwoju tkanek, które wywodzą się z ekto-, endo- i mezodermy i powstają na wczesnym etapie życia płodowego, zwane fakomatozami, stanowią liczną grupę schorzeń predysponujących do rozwoju nowotworów. Wczesna diagnostyka obejmująca identyfikację mutacji oraz ocenę kliniczną umożliwia objęcie pacjentów z potwierdzonym rozpoznaniem wielospecjalistyczną opieką. Dzięki temu można poprawić długoterminowe rokowanie oraz jakość życia chorych. Do najczęstszych fakomatoz należą: nerwiakowłóknikowatość typu 1 i 2 oraz schwannomatoza.

Słowa kluczowe: fakomatozy, schorzenia nerwowo-skróne, nerwiakowłóknikowatość 1, nerwiakowłóknikowatość 2

Wstęp

Fakomatozy, zwane również schorzeniami nerwowo-skrórnymi, stanowią heterogenną grupę uwarunkowanych genetycznie zaburzeń rozwojowych tkanek pochodzących z trzech listków zarodkowych: ekto-, endo- i mezodermy. Objawiają się zmianami w skórze, układzie nerwowym i naczyniowym. Fakomatozy wiążą się ze znaczącym wzrostem ryzyka rozwoju nowotworów [1]. Opieka nad chorym z rozpoznaną fakomatozą obejmuje wielospecjalistyczny nadzór ze szczególnym uwzględnieniem wczesnego wykrywania zmian nowotworowych. Do najczęstszych fakomatoz należą neurofibromatozy (nerwiakowłóknikowatość typu 1 i 2) oraz rzadziej opisywane jednostki chorobowe, takie jak zespoły: Sturge'a i Webera, von Hippel'a i Lindaua, Klippel'a i Trenaunaya, Gorlina i Goltza, Schimmelpennina, Feuersteina i Mimsa, oraz zespół ataksja–teleangiektazja, stwardnienie guzowate i choroba Rendu, Oslera i Webera.

Neurofibromatozy

Według historycznej klasyfikacji (Carey i wsp.) z 1986 r. wyróżniano:

- neurofibromatozę typu 1 (NF1),
 - neurofibromatozę typu 2 (NF2) – akustyczną,
 - neurofibromatozę typu 3 (NF3) – segmentową,
 - neurofibromatozę typu 4 (NF4) – rodzinną,
 - neurofibromatozę typu 5 (NF5) – o fenotypie Noonan [2].
- Obecnie do grupy neurofibromatoz zaliczane są nerwiakowłóknikowatość typu 1, 2 oraz schwannomatoza, z czego nerwiakowłóknikowatość typu 1 stanowi 96% wszystkich rozpoznań [1].

Nerwiakowłóknikowatość typu 1

Nerwiakowłóknikowatość typu 1 (NF1, MIM #162200), zwana również historycznie chorobą von Recklinghausena (od nazwiska Friedricha Daniela von Recklinghausena, który w 1882 r. opisał dwa przypadki symptomatologicznie odpowiadające NF1), jest schorzeniem dziedzicznym autosomalnie dominującym występującym z częstością 1 na 3000 w skali ogólnoswiatowej [2].

Objawy kliniczne obejmują zmiany skórne, kostne oraz naczyniowe, ze szczególnym uwzględnieniem tendencji do tworzenia łagodnych i złośliwych guzów nowotworowych.

Jak cytować / How to cite:

Kofla-Dłubacz A, Stawarski A, Pytrus T, Gil J. *Phacomatoses, genetic testing for personalisation of clinical management (part 1.)*. NOWOTWORY J Oncol 2021; 71: 420–426.

Zaburzenia pigmentacji stanowią objaw patognomiczny dla NF1, jednak ich nasilenie może różnić się znacznie pomiędzy pacjentami, nawet w obrębie tej samej rodziny. Do zmian typowych należą plamy *café au lait* oraz nadmierna pigmentacja pach i pachwin (*freckling in axillary and inguinal regions*). Plamy *café au lait* występują u 95–99% pacjentów z NF1 [1]. Często obecne są już przy urodzeniu, a ich liczba i wielkość wzrasta wraz z wiekiem. Stwierdzenie więcej niż 6 plam o średnicy przekraczającej 0,5 cm przed okresem dojrzewania lub powyżej 1,5 cm po okresie dojrzewania jest jednym z kryteriów diagnostycznych NF1 ustalonych na konferencji The National Institute of Health (NIH) w 1988 r., które do dziś stanowią wytyczne rozpoznawania neurofibromatozy [3, 4]. W badaniu histopatologicznym zmian barwnikowych stwierdza się hiperpigmentację warstwy podstawnej naskórka z obecnością makromelanosomów [1]. Zmiany te nie mają charakteru nowotworowego, jednak stanowią widoczny defekt kosmetyczny, który wpływa na obniżenie jakości życia pacjentów.

Nerwiakowłókniaki

Nerwiakowłókniaki występują u 60% pacjentów z NF1 [1]. Są łagodnymi guzami nowotworowymi wywodzącymi się z osłonek nerwów obwodowych, które mogą ulec transformacji złośliwej. Proliferyją z komórek Schwanna, komórek nabłonkowych, jak również z makrofagów, mastocytów, fibroblastów, perycytów. Wyróżniamy:

- nerwiakowłókniaki skórne (*cutaneous neurofibromas*),
- nerwiakowłókniaki podskórne/wewnętrzne (*subcutaneous/internal neurofibromas*),
- nerwiakowłókniaki splotowate (*plexiform neurofibroms*).

Nerwiakowłókniaki skórne mają postać miękkich, czasem bolesnych i swędzących, narośli w kolorze skóry bądź fioletowym, mogą być pojedyncze lub liczne i obejmować znaczną część powierzchni ciała. Poza skórą nerwiakowłókniaki mogą rozwijać się wzdłuż korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego, czy wyrastać ze splotów nerwowych. Rozrastając się i grupując (tzw. nerwiakowłókniaki splotowate – *plexiform neurofibromas* [PN]), mogą uciskać sąsiadujące struktury anatomiczne i prowadzić do deficytów neurologicznych, zniekształcenia struktur kostnych oraz zmian strukturalnych i czynnościowych narządów wewnętrznych.

Mogą przekształcić się w nowotwór – *malignant peripheral nerve sheath tumor* (MPNST). Ryzyko wystąpienia MPNST u pacjentów z NF1 jest 1000 razy większe w porównaniu z populacją ogólną [5, 6]. Podstawy molekularne transformacji nerwiakowłókniaków splotowatych (PN) w MPNST nie zostały jednoznacznie wyjaśnione, ale wykazano, że wpływa na nią dysregulacja szlaku sygnałowego RAS/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) i PI3K-AKT-mTOR [7, 8]. Komórki Schwanna zgromadzone w masie guza stymulowane są do złośliwej proliferacji przez czynniki wzrostu wydzielane z otaczających komórek: mastocytów, makrofagów, fibroblastów. Uraz okolicy

guza – wpływając na migrację mastocytów – może sprzyjać transformacji nowotworowej [7].

Formą przednowotworową przemiany PN w MPNST jest nerwiakowłókniak atypowy (*atypical neurofibroma* – ANF) [5, 6]. Podstawową formą leczenia ANF oraz MPNST jest resekcja chirurgiczna. MPNST rozwija się u 8–13% pacjentów i stanowi główną przyczynę zgonów w przebiegu NF1 [7, 9]. Leczenie chirurgiczne z dużym marginesem pola wokół guza nie zapobiega w pełni wznowie miejscowej, która występuje u 25–37% chorych [10]. Leczenie farmakologiczne MPNST nie jest efektywne. Stosowanie doksorubicyny, etopozydu i ifosfamidu w wybranych grupach pacjentów może być jednak skuteczne w ograniczeniu progresji choroby w postaciach przerzutowych i nieoperacyjnych [11]. Inhibitory szlaku mTOR, które są w trakcie badań, wydają się obiecujące [12]. Nie wykazano skuteczności innych stosowanych w ramach badań klinicznych leków: inhibitorów kinazy tyrozynowej, erlotynibu, sorafenibu [13].

Guzy nieneurofibromatyczne

Pacjenci z NF1 mają podwyższone w stosunku do populacyjnego ryzyko rozwoju guzów mózgu. Guzy mózgu występujące u chorych z NF1 to najczęściej glejaki nerwu wzrokowego (15–20% pacjentów), glejaki pnia mózgu, międzymózgowia i mózdzku [14].

Gwiaździatek włosowatokomórkowy (*astrocytoma pilocyticum*) jest guzem o małej złośliwości (I wg WHO) i może ulec samoistnej remisji u chorych z NF1. U pacjentów w okresie rozwoju mogą występować również tzw. *unidentified bright objects* (UBO), zmiany o charakterze nienowotworowym w obrębie mózgowia, które powstają i zanikają w sposób dynamiczny. Ich występowanie może wpływać na obserwowane u pacjentów zaburzenia zachowania o typie ADHD, upośledzenie umysłowe czy epilepsję [15].

Wśród guzów o lokalizacji innej niż ośrodkowy układ nerwowy wymienić należy: guzy endokrynne, w tym guz chromochłonny nadnercza (*pheochromocytoma*) spotykany u 5% pacjentów z NF1 w stosunku do poniżej 1% w populacji ogólnej [1]. Charakterystycznymi objawami guza chromochłonnego są nadciśnienie tętnicze, zaburzenia rytmu serca, nagłe zaczerwienienie twarzy (*flushing*).

Zmiany nowotworowe mogą lokalizować się również w przewodzie pokarmowym. Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego – *gastro-intestinal stromal tumors* (GIST) występują u ok. 20% pacjentów z NF1 [16]. Mają pochodzenie mezenchymalne, wywodzą się z komórek Cajala. Często małe, długo bezobjawowe, wykrywane są w trakcie badań endoskopowych oraz obrazowych jamy brzusznej. Guzy endokrynne przewodu pokarmowego, które mogą wystąpić w przebiegu NF1 to m.in.: somatostatynoma, gastrinoma [16].

W dzieciństwie może pojawić się również nielimfocytarna białaczka wieku dziecięcego, guz Wilmsa czy *rhabdomyosarcoma*, których ryzyko wystąpienia jest 20-krotnie wyższe u pacjentów z NF1 w porównaniu z populacją ogólną [1].

Objawy oczne obejmują hamartomatyczne guzki Lisha, które wywodzą się z komórek barwnikowych, fibroblastów i mastocytów, przyjmując kształt charakterystycznych nierówności tęczówki w odcieniach brązu [2]. Zmiany te nie wpływają na ostrość widzenia i występują u ponad 90% dorosłych chorych (liczba ich rośnie z wiekiem). Poważną manifestacją NF1 są glejaki nerwu wzrokowego (nowotwory przedniego odcinka drogi wzrokowej). Objawiają się zanikiem nerwu wzrokowego i postępującą utratą wzroku, a także wytrzeszczem, oczopląsem (tzw. *see-saw nystagmus*) oraz symptomami, które wynikają ze wzmożonego ciśnienia śródczaszkowego. Glejaki nerwu wzrokowego występują u około 15% pacjentów z NF1, a współistnienie guza z NF1 stwierdza się w 50% wszystkich zachorowań na ten typ nowotworu [14]. Histologicznie najczęściej jest to gwiaździak włosatokomórkowy. Jego lokalizacja ogranicza możliwość chirurgicznej interwencji. Wśród innych objawów ocznych spotykanych w przebiegu NF1 wymienić należy znamiona naczyńówki i wrodzoną jaskrę [17].

Objawy z układu kostnego obejmują skoliozę, głównie odcinka szyjno-piersiowego, stawy rzekome kości długich oraz dysplazje kostne. Wzrost pacjentów może być obniżony z powodu deformacji kostnych, a złamania kostne są częste. Mechanizm rozwoju tych zmian nie został poznany, jednak obserwowano u pacjentów z NF1 niewystarczające poziomy witaminy D₃ i mniejszą gęstość kości w porównaniu z populacją ogólną [1, 18]. Zmiany opisywane w układzie sercowo-naczyniowym to między innymi: zwężenia w zakresie pnia płucnego, tętnic mózgowych i nerkowych, które mogą prowadzić do nadciśnienia, zawałów mięśnia sercowego, niezdolności serca.

Leczenie nowotworów rozpoznawanych w przebiegu neurofibromatozy typu 1 odbywa się według protokołów terapeutycznych dla postaci niezwiązanych z NF.

Kryteria diagnostyczne nerwiakowłóknikowości typu 1

Aby stwierdzić nerwiakowłóknikowość typu 1, muszą być obecne co najmniej dwa objawy [18]:

- sześć lub więcej zmian skórnych typu *café au lait* o średnicy większej niż 5 mm u dziecka przed okresem dojrzewania i większej niż 15 mm po okresie dojrzewania,
- wzmożona pigmentacja pach i pachwin,
- glejak nerwu wzrokowego,
- dwa lub więcej nerwiakowłókników lub jeden nerwiakowłóknik spłotowaty,
- krewny pierwszego stopnia z nerwiakowłóknikowością typu 1,
- dwa lub więcej guzki Lisha (barwnikowe guzki hamartomatyczne siatkówki) widoczne w badaniu lampą szczelinową,
- charakterystyczne zmiany kostne (dysplazja kości klinowej, ścieńczenie kory kości długich z pseudoartrozą lub bez).

Podłoże genetyczne NF1

Warianty patogenne genu NF1 stanowią podstawę molekularną rozwoju nerwiakowłóknikowości typu 1. Gen *NF1* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 17 (*locus* q11.2) koduje 2818-aminokwasowe białko cytoplazmatyczne, o masie od 320 kDa – neurofibrominę 1 (NF1, MIM *613113) [19]. Gen ten zawiera 61 egzonów, z czego 5 podlega alternatywnemu splicingowi (9a, 10a-2, 23a, 43 i 48a), który prowadzi do powstawania różnych izoform neurofibrominy. Znanych jest pięć izoform białka, a ich ekspresja jest charakterystyczna dla określonych komórek i/lub tkanek [20]. Neurofibromina jest wielofunkcyjnym białkiem zaangażowanym w liczne szlaki sygnałowe i reguluje szereg procesów komórkowych oraz odgrywa znaczącą rolę w embriogenezie [21]. Obecność neurofibrominy wykrywana jest w większości komórek ciała, ale największa jej ekspresja obserwowana jest w komórkach układu nerwowego, astrocytach, oligodendrocytach i komórkach Schwanna [20].

Główna funkcja neurofibrominy sprowadza się do negatywnej regulacji szlaku Ras, na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego poprzez aktywację GTPazy (*GTPase activating protein* – GAP). Regulacja GAP polega na przyspieszeniu hydrolizy GTP (guanozyno-5'-trifosforanu) związanego z Ras do GDP (guanozyno-5'-difosforanu) – poprzez zwiększenie wewnętrznej aktywności GTPazy Ras. „Przełącza” to aktywną formę protoonkogenu *Ras* do formy nieaktywnej [19]. Białka szlaku Ras kodowane są przez geny *HRAS*, *KRAS* i *NRAS*, a ich produkty białkowe odgrywają kluczową rolę w procesach komórkowych, takich jak: apoptoza, cykl komórkowy, proliferacja, różnicowanie lub migracja komórek [20]. W związku z pełnioną funkcją NF1 zaklasyfikowano do grupy genów supresorowych (antyonkogenu). Brak funkcjonalnego białka *NF1* (NF1-/-) prowadzi do zaburzenia homeostazy komórkowej oraz do braku kontroli nad aktywnością ścieżki Ras, a w konsekwencji do niekontrolowanej proliferacji. To z kolei może przyczynić się do rozpoczęcia procesu transformacji nowotworowej. Za aktywność katalityczną *NF1* odpowiada centralna część białka, tzw. domena związana z GAP (*GAP-related domain* – GRD) [22].

Heterozygotyczna mutacja genu *NF1* odpowiada za około 95% przypadków neurofibromatozy typu 1, a sposób dziedziczenia jest autosomalnie dominujący. W około połowie przypadków zmiana patogenna jest dziedziczona od jednego z rodziców, natomiast w pozostałych 50% powstaje *de novo* [23]. Gen *NF1* ma największy potencjał mutageny wśród ludzkich genów i do chwili obecnej znanych jest ponad 2600 patogennych jego wariantów [23]. Choroba w wieku dorosłym ma całkowitą penetrację, natomiast obserwowane jest bardzo szerokie spektrum jej ekspresji (objawy kliniczne, fenotyp).

Poza kilkoma wyjątkami, nie ma danych, które wskazują na korelację pomiędzy typem mutacji a przebiegiem klinicznym NF1 (korelacja genotyp-fenotyp). Zresztą przebieg NF1 jest niezwykle zróżnicowany, nie tylko wśród członków tej samej rodziny (posiadających tę samą mutację), ale nawet dotyczy

pojedynczego pacjenta w różnych okresach jego życia. Pierwszy wyjątek stanowi grupa pacjentów z dużą delecją, obejmującą gen *NF1* oraz regiony przyległe. Fenotyp charakteryzuje się cięższą formą w porównaniu z pacjentami z mutacjami w obrębie genu. Obserwowane są cechy dymorficzne twarzy, przerost somatyczny, zaburzenia poznawcze, ADHD oraz wczesne pojawienie się dużej liczby nerwiakowłókniaków skórnych [24]. Kolejnym przypadkiem jest delecja 3 par zasad w egzonie 17 (c.2970-2972 delAAT), która wiąże się z łagodniejszym przebiegiem choroby. Obserwuje się charakterystyczne cechy barwnikowe, ale nie występują skórne i splotowate nerwiakowłókniaki [25]. Ostatnim przykładem korelacji genotyp–fenotyp jest pojawienie się w kilku wariantów zmiany sensu (*missense*), które przyczyniają się do podstawienia innych aminokwasów w miejsce argininy w kodonie 1809. U tych pacjentów obserwuje się plamy *café au lait*, trudności w uczeniu się, niski wzrost i zwężenie płuc, jednak nie ma nerwiakowłókniaków skórnych oraz klinicznie widocznych nerwiakowłókniaków splotowatych [26].

Istnieje również forma NF1, która obejmuje jedynie niektóre części ciała. Jest to tzw. forma segmentowa/segmentalna. Mutacje *NF1* ograniczają się wyłącznie do obszarów ciała objętych symptomami choroby. W związku z tym nie stwierdza się mutacji konstytucyjnej w limfocytach czy fibroblastach, a jedynie w komórkach z segmentu objętego chorobą. Najczęściej taka forma wynika z pojawienia się mutacji *de novo* w trakcie embriogenezy (mozaicyzm) i zazwyczaj nie dotyczy komórek płciowych (brak ryzyka przekazania choroby). Jest to choroba bardzo trudna do zdiagnozowania [27].

Testy genetyczne

Podstawą rozpoznania NF1 jest diagnoza kliniczna. Jednak testy genetyczne, które umożliwiają identyfikację zmiany w obrębie genu *NF1*, zyskują coraz większe znaczenie, szczególnie dla pacjentów z podejrzeniem choroby, ale niespełniających wymaganych kryteriów klinicznych.

Rekomendowaną metodą jest analiza sekwencji genomowego DNA (gDNA) lub tylko sekwencji kodującej (cDNA), którą przeprowadza się łącznie z analizą rearanżacji (mikrodelecji pojedynczych egzonów) i/lub delecji całego genu *NF1* [28]. Takie podejście pozwala zidentyfikować 95% patogennych wariantów *NF1* u osób spełniających kryteria diagnostyczne NIH (amerykańskich Narodowych Instytutów Zdrowia). Warianty patogenne występują w całym genie *NF1* (brak tzw. „punktów gorących” – *hot spot*). Ich różnorodność obejmuje m.in. substytucje pojedynczych nukleotydów, małe insercje i delecje (które zarówno nie zmieniają, jak i zmieniają ramkę odczytu) oraz fakt, że około 22–30% mutacji wpływa na *splicing*. Toteż metody analizy cDNA wydają się być bardziej wartościowe pod kątem diagnostycznym [28, 29]. W przypadku podejrzenia klinicznego fenotypu mikrodelecji identyfikację delecji genu *NF1* można przeprowadzić za pomocą badań: FISH (z użyciem sondy specyficznej), MLPA, qPCR lub wykonać badanie

porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (*array comparative genomic hybridization* – aCGH). Przyczyną utraty genu *NF1* mogą być aberracje chromosomowe, które wykrywane są w badaniu cytogenetycznym (najczęściej translokacje lub inwersje chromosomu 17 z punktem złamania q11.2). Aberracje chromosomowe są odpowiedzialne za NF1 u mniej niż 1% osób dotkniętych chorobą [28].

Zastosowanie różnych algorytmów pozwala zidentyfikować zmiany ze zróżnicowanym odsetkiem skuteczności [28]:

- klasyczne badanie cytogenetyczne – zmiana wykrywana u około 1% pacjentów,
- analiza delecji całego genu lub części genu *NF1* – około 10%,
- analiza mutacji gDNA – 60–90%,
- algorytm złożony z analizy cDNA, gDNA oraz analizy rearanżacji/delecji genu *NF1* – powyżej 95%.

Warto również nadmienić, że ostatnie lata przyniosły ogromny rozwój w badaniach genetycznych i coraz łatwiej jest o dostęp do platform sekwencjonowania następnej generacji NGS (*next-generation sequencing*), które pozwalają na szybką diagnostykę. Aktualnie wiele firm oferuje panele genowe do analizy różnych neurofibromatoz co oznacza, że jednocześnie przeprowadza się sekwencjonowanie kilku genów o kluczowym znaczeniu np. *NF1*, *NF2*, *SMARCB1*, *SPRED1*, *VHL*, *TSC1* czy *TSC2*.

Poradnictwo genetyczne

Identyfikacja patogennego wariantu genu *NF1* jest niezwykle istotna dla osób w wieku prokreacyjnym, gdyż umożliwia udzielenie porady prokreacyjnej i rodzinnej – możliwa jest diagnostyka prenatalna i preimplantacyjna. Każdy nosiciel uszkodzonego genu ma 50% ryzyko jego przekazania potomstwu. Natomiast jeśli u dziecka z poprzedniej ciąży rozpoznano NF1 oraz stwierdzono obecność mutacji genu *NF1*, ale nie stwierdzono tej zmiany u rodziców, to ryzyko urodzenia kolejnego dziecka z chorobą jest niskie [30]. Nie można, jednak wykluczyć istnienia mozaicyzmu germinalnego u jednego z rodziców (mutacja obecna tylko w komórkach płciowych). Wtedy ryzyko urodzenia chorego dziecka znacznie wzrasta. Prenatalne testy molekularne można wykonać na DNA wyizolowanym z kosmków trofoblastu lub amniocytów.

Poradnictwo genetyczne ma kluczowe znaczenie dla par, które decydują się wykonać badania prenatalne w kierunku NF1 ze względu na szerokie spektrum objawów oraz zmienną ekspresję choroby [30]. Średnia długość życia pacjentów z NF1 jest o około 8 lat krótsza niż w populacji ogólnej, szczególnie ze względu na rozwój nowotworów złośliwych oraz waskułopatii [28].

Nerwiakowłókniakowość typu 2

Nerwiakowłókniakowość typu 2 (MIM #101000) jest chorobą dziedziczną autosomalnie dominującą i występuje z częstością 1:25 000–50 000 [31]. W 50% przypadków występuje

rodzinnie, kolejne 50% to mutacje *de novo*. Obserwuje się częsty mozaicyzm, który wpływa na objawy kliniczne choroby.

Neurofibromatoza typu 2, podobnie jak NF1, jest stanem predysponującym do rozwoju nowotworów. W obrazie klinicznym dominują objawy związane z tworzeniem guzów o charakterze *schwannoma* (nerwiaki osłonkowe) w obrębie nerwów czaszkowych, rdzeniowych i obwodowych, *meningioma* (oponiaki), które mogą lokalizować się wewnątrzczaszkowo i wewnątrzkręgowo oraz *ependymoma* (wyściółczaki).

Obustronny nerwiak części przedsionkowej nerwu słuchowego (*vestibular schwannoma*) jest patognomoniczny dla neurofibromatozy typu 2 i występuje u 90% pacjentów [1]. Szumy uszne, postępująca pozaślismakowa utrata słuchu, zawroty głowy oraz zaburzenia równowagi są dominującymi objawami występującymi u pacjentów. W późnym okresie choroby mogą wystąpić nudności i wymioty. Nerwiak nerwu przedsionkowego w przebiegu NF2 różni się od nerwiaków występujących sporadycznie z poliklonalnym rozrostem wydzielającym się z odrębnych linii nowotworowych komórek, które prezentują odrębny typ mutacji NF2. Daje to obraz zrakowatości w badaniach radiologicznych [32]. Powiększanie się masy guza prowadzi do postępującej utraty słuchu, przy znacznym rozroście może uciskać pień mózgu oraz dawać objawy związane z zajęciem nerwów twarzowych. Leczenie chirurgiczne będące podstawą terapii, jest technicznie trudne, a liczba nawrotów częstsza niż w postaci sporadycznej – wynosi 44% vs. 1,3% [1]. Zwiększone ryzyko transformacji złośliwej w przypadku *schwannoma* związanych z NF2 w odpowiedzi na radioterapię ogranicza możliwość stosowania tego typu leczenia [1]. W ramach chemioterapii podejmuje się próby stosowania bewacyzumabu, który jest inhibitorem naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) [33].

Nerwiaki osłonkowe pozostałych nerwów czaszkowych i obwodowych prowadzą do wystąpienia niedowładów, m.in.: niedowładu mięśni mimicznych twarzy (porażenie Bella), zez a oraz zaburzeń czucia. U dzieci można zaobserwować objawy typu polio z zajęciem kończyn dolnych [31]. Guzy śródczaszkowe, czyli oponiak, glejak, wyściółczak, mogą dawać objawy ogniskowe, drgawki, bóle głowy, nadmierną senność, wymioty wraz ze wzrostem ciśnienia śródczaszkowego – efekt masy. Oponiaki (*meningiomas*) występują u około 50% pacjentów z NF2, w dużej części już w dzieciństwie, kiedy współistnienie oponiaków i NF2 stwierdza się u około 20% [1]. Wyściółczaki (*ependymomas*) występują stosunkowo rzadko na tle innych typów nowotworów w NF2, lokalizują się głównie śródrdzeniowo w odcinku szyjnym i tworzą charakterystyczne korale (*string of pearl*) w obrazie radiologicznym [1].

Nerwiaki nerwów czaszkowych i oponiaki opisywane są u około 50% pacjentów, nerwiaki nerwów rdzeniowych i pni obwodowych – u 40% chorych [1]. Podczas gdy oponiaki znacznie pogarszają rokowanie i stanowią częstą przyczynę

zgonów wśród pacjentów z neurofibromatozą, wyściółczaki długo pozostają bezobjawowe i wykrywane są podczas badań okresowych u osób obciążonych chorobą.

Zaburzenia widzenia u pacjentów z NF2 wynikają z obecności oponiaków osłonek nerwów wzrokowych, guzów o typie *hamartoma* nabłonka barwnikowego siatkówki oraz zaćmy podtorebkowej tylnej. Natomiast zmiany skórne o charakterze nerwiakowłókniaków są rzadsze niż w NF1, a ich cechą charakterystyczną są wyrastające włoski. Nerwiakowłókniaki podskórne, podobnie jak plamy *café au lait*, nie są liczne, bądź mogą w ogóle nie występować.

Kryteria diagnostyczne nerwiakowłókniakowości typu 2 – kryteria Manchester

Kryteria główne:

- obustronny guz nerwu VIII (wykazany w badaniach obrazowych – MR/TK lub potwierdzony histologicznie),
- krewny pierwszego stopnia z nerwiakowłókniakowatością typu 2 i jednostronnym guzem nerwu VIII,
- krewny pierwszego stopnia z nerwiakowłókniakowatością typu 2 oraz stwierdzenie dwóch z następujących zmian: nerwiakowłókniaki, oponiaki, nerwiaki osłonkowe, glejaki, młodzieńcze, tylne podtorebkowe zmętnienie soczewki.

Kryteria dodatkowe:

- jednostronny guz nerwu VIII i którykolwiek z wymienionych: oponiak, glejak, nerwiakowłókniak, nerwiak osłonkowy, tylne podtorebkowe zmętnienie soczewki,
- mnogie oponiaki (dwa lub więcej) i jednostronny guz nerwu VIII lub którykolwiek z wymienionych: glejak, nerwiakowłókniak, nerwiak osłonkowy, zaćma [1].

Podłoże genetyczne nerwiakowłókniakowości typu 2

Gen *NF2* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 22 (locus q12.2), koduje białko merlinę (inne nazwy: schwannomina, neurofibromina 2, MIM *607379) zbudowane z 595 aminokwasów o masie 70 kDa. Gen zawiera 17 egzonów, w tym jeden ulegający alternatywnemu splicingowi. Znanych jest co najmniej 8 różnych izoform białka [34]. Merlina to akronim od *moezin-ezrin-radixin-like protein*, ponieważ białko to wykazuje wysoką homologię do rodziny białek 4.1 związanych z cytoszkieletem. Merlina jest zaangażowana w tworzenie podbłonowego cytoszkieletu komórkowego, łączy włókna aktyny z błoną komórkową lub glikoproteinami błonowymi. Podobnie jak *NF1* gen *NF2* jest genem supresorowym, a jego funkcją jest hamowanie proliferacji komórkowej (negatywny regulator wzrostu), osłabianie adhezji i migracji, które są charakterystyczne dla procesów nowotworzenia. Merlina ulega ekspresji w wielu tkankach, a szczególnie w neuronach oraz komórkach Schwanna [35].

Podłoże genetyczne *NF2* stanowią patogenne zmiany genu *NF2*. *NF2* jest dziedziczona autosomalnie dominująco i charakteryzuje się pełną penetracją. Około 50% osób z *NF2*

ma chorego rodzica, a u kolejnych 50% choroba rozwija się w wyniku obecności wariantu patogennego powstałego *de novo*. W NF2 często obserwowany jest mozaicyzm, który dotyczy 30–60% przypadków z mutacją *de novo*. Oznacza to, że tylko część komórek pacjenta ma patogenną zmianę, a część – prawidłową formę genu (oba allele typu dzikiego) [36]. W związku z tym w standardowych testach genetycznych taka zmiana może pozostać niezidentyfikowana. Postać mozaikowa wiąże się z łagodniejszym przebiegiem choroby i może ograniczać się tylko do pewnych obszarów ciała. Ryzyko przekazania zmiany potomstwu w takim przypadku jest niższe niż 50%. Zależy ono od liczby komórek rozrodczych z patogenną zmianą. Jeśli jednak zmiana zostanie przekazana potomstwu, to obserwowany będzie cięższy fenotyp niż u rodzica – ze względu na to, że dziecko ma mutacje we wszystkich komórkach ciała [36–38]. Zmianę mozaikową można wykryć analizując DNA z guza. Jeśli taka sama zmiana zostanie znaleziona w dwóch guzach, można w dalszej kolejności przebadac potomstwo pacjenta pod kątem nosicielstwa tej zmiany genetycznej [37]. Podobnie jak w NF1 po zidentyfikowaniu patogennego wariantu NF2 w rodzinie możliwe są badania prenatalne oraz testy genetyczne przed implantacją.

W odniesieniu do korelacji genotyp–fenotyp stwierdzono, że pacjenci z NF2 z konstytucyjnymi mutacjami nonsensownymi (przedwczesne wystąpienie kodonu stop) lub mutacjami zmiany ramki odczytu (które prowadzą do skrócenia produktu białkowego), chorują ciężiej w porównaniu z osobami z mutacjami zmiany sensu (*missense*) (produkt białkowy o prawidłowej długości) oraz z osobami z delecją genu (brak produktu białkowego) [39]. Ponadto na różnicowany fenotyp wpływają mutacje w miejscach splicingowych. Pacjenci z mutacjami w obszarze 5' charakteryzują się cięższym przebiegiem choroby w porównaniu z osobami z mutacjami w obszarze 3'. Ponadto typ mutacji wpływa również na relatywne ryzyko śmierci. Z kolei pacjenci z mutacjami typu zmiany sensu mają niższe ryzyko śmierci w porównaniu z chorymi ze zmianami typu *nonsense* czy przesunięciem ramki odczytu [38].

Testy genetyczne

Podobnie jak w przypadku NF1, podejście diagnostyczne ukierunkowane na rozpoznanie zmiany leżącej u podstaw NF2 może być wieloetapowe. W zależności od fenotypu można przeprowadzić analizę sekwencji pojedynczego genu lub panelu kilku kluczowych genów, albo zastosować aCGH, sekwencjonowanie egzomu, macierze egzomowe czy sekwencjonowanie genomu [40].

Diagnostyka różnicowa

Podczas różnicowania fakomatoz należy uwzględnić zespoły fenotypowo zbliżone do nerwiakowłóknikowości, w przebiegu których występują charakterystyczne zmiany skórne oraz tendencja do rozrostu nowotworowego.

Zespół Legiusa jest schorzeniem genetycznym dziedziczonym autosomalnie dominująco. Charakteryzuje się zaburzeniami pigmentacji skóry bez cech towarzyszących jak NF1. Trudności we wczesnym ustaleniu właściwego rozpoznania wynikają z podobieństwa obu schorzeń i zróżnicowanej osobniczo ekspresji cech fenotypowych NF1. W przebiegu zespołu Legiusa manifestacja skórna obejmuje plamy typu *cafe au lait* (co najmniej sześć), których liczba zwiększa się wraz z wiekiem, oraz wzmożoną pigmentację pach i pachwin. Mogą także występować: makrocefalia, niski wzrost, deformacje klatki piersiowej, deficyty funkcji poznawczych, ADHD oraz opóźnienie rozwoju. Nie spotyka się natomiast typowych dla NF1 nerwiakowłókników, guzków Lischa i glejaków drogi wzrokowej. Właściwe różnicowanie zespołu Legiusa z nerwiakowłóknikowością 1 jest niezwykle istotne z uwagi na różnice w rokowaniu, które w zespole Legiusa jest znacząco lepsze w porównaniu z NF1 [40, 41]. Podstawę genetyczną zespołu Legiusa stanowią mutacje genu *SPRED1* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 15 (locus q13.2). Podobnie jak w NF1 białko SPRED1 jest negatywnym regulatorem szlaku RAS-MAPK [41, 42].

Wśród innych schorzeń, które wymagają różnicowania z neurofibromatozą 1, i w przebiegu których występują zmiany skórne typu *cafe au lait*, wymienić należy:

- *constitutional mismatch repair deficiency* (geny z grupy *mismatch repair* – *MMR*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*),
- liczne, rodzinne plamy typu *cafe au lait* (*multiple familial café au lait spots*),
- zespoły:
 - McCune i Albrighta (gen *GNAS*),
 - Noonan (geny *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*),
 - Noonan z licznymi zmianami soczewicowatymi (geny *PTPN11*, *RAF1*),
- mnogie łagodne guzy nowotworowe, w tym guzy o typie *hamartoma* w zespołach:
 - Proteusza (gen *AKT1*),
 - Cowden (geny *PTEN*, *KLLN*, *WWP1*),
 - licznych orbitalnych zmian o typie *neurofibroma*.

Osoby z podejrzeniem tych schorzeń wymagają diagnostyki genetycznej, a w razie potwierdzenia rozpoznania całą rodzinę trzeba objąć poradnictwem genetycznym.

Od 15 czerwca 2020 r. w Polsce, zgodnie z rozporządzeniem ministra zdrowia, wdrożono program pilotażowy w zakresie koordynowanej opieki medycznej nad chorymi z neurofibromatozami oraz pokrewnymi im rasopatiami. Celem programu jest poprawa efektywności diagnostyki i leczenia oraz wczesne wykrywanie problemów zdrowotnych charakterystycznych dla tej grupy pacjentów. Pacjenci włączeni do programu otrzymują kompleksową opiekę zespołu lekarzy specjalistów, m.in. neurologów, psychiatrów, endokrynologów, otolaryngologów, chirurgów, ortopedów i innych – w zależności od indywidualnych potrzeb.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Anna Kofla-Dłubacz

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wydział Lekarski

II Katedra i Klinika Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia

ul. M. Curie-Skłodowskiej 50/52

55-369 Wrocław

e-mail: anna.kofla-dlubacz@umed.wroc.pl

Otrzymało: 19 maja 2021

Zaakceptowano: 18 października 2021

Piśmiennictwo

1. Kresak JL, Walsh M. Neurofibromatosis: A Review of NF1, NF2, and Schwannomatosis. *J Pediatr Genet.* 2016; 5(2): 98–104, doi: 10.1055/s-0036-1579766, indexed in Pubmed: 27617150.
2. Antônio JR, Goloni-Bertollo EM, Trídico LA. Neurofibromatosis: chronological history and current issues. *An Bras Dermatol.* 2013; 88(3): 329–343, doi: 10.1590/abd1806-4841.20132125, indexed in Pubmed: 23793209.
3. Neurofibromatosis. *Archives of Neurology.* 1988; 45(5): 575, doi: 10.1001/archneur.1988.00520290115023.
4. 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): 608–614, doi: 10.1542/peds.105.3.608, indexed in Pubmed: 10699117.
5. Korfhage J, Lombard DB. Malignant eriheral nerve sheath tumors: From eigenome to bedside. *Mol Cancer Res.* 2019; 17(7): 1417–1428, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0147, indexed in Pubmed: 31023785.
6. Seminog OO, Goldacre MJ. Risk of benign tumours of nervous system, and of malignant neoplasms, in people with neurofibromatosis: population-based record-linkage study. *Br J Cancer.* 2013; 108(1): 193–198, doi: 10.1038/bjc.2012.535, indexed in Pubmed: 23257896.
7. Park GH, Lee SJ, Yim H, et al. TAGLN expression is upregulated in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors by hypomethylation in its promoter and subpromoter regions. *Oncol Rep.* 2014; 32(4): 1347–1354, doi: 10.3892/or.2014.3379, indexed in Pubmed: 25109740.
8. Katz D, Lazar A, Lev D. Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST): the clinical implications of cellular signalling pathways. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 11: e30, doi: 10.1017/S1462399409001227, indexed in Pubmed: 19835664.
9. Evans DGR, Baser ME, McGaughan J, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *J Med Genet.* 2002; 39(5): 311–314, doi: 10.1136/jmg.39.5.311, indexed in Pubmed: 12011145.
10. Watson KL, Al Sanna GA, Kivlin CM, et al. Patterns of recurrence and survival in sporadic, neurofibromatosis Type 1-associated, and radiation-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neurosurg.* 2017; 126(1): 319–329, doi: 10.3171/2015.12.JNS152443, indexed in Pubmed: 27035165.
11. Higham CS, Steinberg SM, Dombi E, et al. SARC006: Phase II Trial of Chemotherapy in Sporadic and Neurofibromatosis Type 1 Associated Chemotherapy-Naive Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Sarcoma.* 2017; 2017: 8685638, doi: 10.1155/2017/8685638, indexed in Pubmed: 29138631.
12. Patwardhan PP, Surriga O, Beckman MJ, et al. Sustained inhibition of receptor tyrosine kinases and macrophage depletion by PLX3397 and rapamycin as a potential new approach for the treatment of MPNSTs. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(12): 3146–3158, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2576, indexed in Pubmed: 24718867.
13. D'Adamo DR, Dickson MA, Keohan ML, et al. A Phase II Trial of Sorafenib and Dacarbazine for Leiomyosarcoma, Synovial Sarcoma, and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Oncologist.* 2019; 24(6): 857–863, doi: 10.1634/theoncologist.2018-0160, indexed in Pubmed: 30126857.
14. Hirbe A, Gutmann D. Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *The Lancet Neurology.* 2014; 13(8): 834–843, doi: 10.1016/s1474-4422(14)70063-8.
15. Bergqvist C, Servy A, Valeyrie-Allanore L, et al. NF France Network. Neurofibromatosis 1 French national guidelines based on an extensive literature review since 1966. *Orphanet J Rare Dis.* 2020; 15(1): 37, doi: 10.1186/s13023-020-1310-3, indexed in Pubmed: 32014052.
16. Agaimy A, Vassos N, Croner RS. Gastrointestinal manifestations of neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen's disease): clinicopathological spectrum with pathogenetic considerations. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012; 5(9): 852–862, indexed in Pubmed: 23119102.
17. Liu S, Ran Li, Qi D, et al. Neovascular glaucoma in a pediatric patient with neurofibromatosis type 1: a case report. *BMC Ophthalmol.* 2020; 20(1): 168, doi: 10.1186/s12886-020-01438-5, indexed in Pubmed: 32345252.
18. 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): 81–88, doi: 10.1136/jmg.2006.045906, indexed in Pubmed: 17105749.
19. Bergoug M, Doudeau M, Godin F, et al. Neurofibromin Structure, Functions and Regulation. *Cells.* 2020; 9(11), doi: 10.3390/cells9112365, indexed in Pubmed: 33121128.
20. Trovó-Marqui AB, Tajara EH. Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet.* 2006; 70(1): 1–13, doi: 10.1111/j.1399-0004.2006.00639.x, indexed in Pubmed: 16813595.
21. Abramowicz A, Gos M. Neurofibromin in neurofibromatosis type 1 - mutations in NF1 gene as a cause of disease. *Dev Period Med.* 2014; 18(3): 297–306, indexed in Pubmed: 25182393.
22. Scheffzek K, Welti S. Neurofibromin: Protein Domains and Functional Characteristics. *Neurofibromatosis Type 1.* 2012: 305–326, doi: 10.1007/978-3-642-32864-0_20.
23. Pacot L, Burin des Roziers C, Laurendeau I, et al. One Mutation may Conceal Another. *Genes (Basel).* 2019; 10(9), doi: 10.3390/genes10090633, indexed in Pubmed: 31443423.
24. Mautner VF, Kluwe L, Friedrich RE, et al. Clinical characterisation of 29 neurofibromatosis type-1 patients with molecularly ascertained 1.4 Mb type-1 NF1 deletions. *J Med Genet.* 2010; 47(9): 623–630, doi: 10.1136/jmg.2009.075937, indexed in Pubmed: 20543202.
25. 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): 140–151, doi: 10.1086/510781, indexed in Pubmed: 17160901.
26. Rojnueangnit K, Games A, Sharp A, et al. High Incidence of Noonan Syndrome Features Including Short Stature and Pulmonic Stenosis in Patients carrying NF1 Missense Mutations Affecting p.Arg1809: Genotype-Phenotype Correlation. *Hum Mutat.* 2015; 36(11): 1052–1063, doi: 10.1002/humu.22832, indexed in Pubmed: 26178382.
27. Freret ME, Anastasaki C, Gutmann DH. Independent mutations underlie café-au-lait macule development in a woman with segmental NF1. *Neurol Genet.* 2018; 4(4): e261, doi: 10.1212/NXG.0000000000000261, indexed in Pubmed: 30065955.
28. Friedman J. Neurofibromatosis 1 Synonyms: NF1, Von Recklinghausen Disease, Von Recklinghausen's Neurofibromatosis. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. ed. *GeneReviews*. University of Washington, Seattle 1993–2021.
29. Morbidoni V, Baschiera E, Forzan M, et al. Hybrid Minigene Assay: An Efficient Tool to Characterize mRNA Splicing Profiles of Variants. *Cancers (Basel).* 2021; 13(5), doi: 10.3390/cancers13050999, indexed in Pubmed: 33673681.
30. Radtke HB, Sebold CD, Allison C, et al. Neurofibromatosis type 1 in genetic counseling practice: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns.* 2007; 16(4): 387–407, doi: 10.1007/s10897-007-9101-8, indexed in Pubmed: 17636453.
31. Evans DG. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis.* 2009; 4: 16, doi: 10.1186/1750-1172-4-16, indexed in Pubmed: 19545378.
32. Dewan R, Pemov A, Kim HJ, et al. Evidence of polyclonality in neurofibromatosis type 2-associated multilobulated vestibular schwannomas. *Neuro Oncol.* 2015; 17(4): 566–573, doi: 10.1093/neuonc/nou317, indexed in Pubmed: 25452392.
33. Plotkin SR, Duda DG, Muzikansky A, et al. Multicenter, Prospective, Phase II and Biomarker Study of High-Dose Bevacizumab as Induction Therapy in Patients With Neurofibromatosis Type 2 and Progressive Vestibular Schwannoma. *J Clin Oncol.* 2019; 37(35): 3446–3454, doi: 10.1200/JCO.19.01367, indexed in Pubmed: 31626572.
34. Chang LS, Akhmetmeteva EM, Wu Y, et al. Multiple transcription initiation sites, alternative splicing, and differential polyadenylation contribute to the complexity of human neurofibromatosis 2 transcripts. *Genomics.* 2002; 79(1): 63–76, doi: 10.1006/geno.2001.6672, indexed in Pubmed: 11827459.
35. Mindos T, Dun XP, North K, et al. Merlin controls the repair capacity of Schwann cells after injury by regulating Hippo/YAP activity. *J Cell*

- Biol. 2017; 216(2): 495–510, doi: 10.1083/jcb.201606052, indexed in Pubmed: 28137778.
36. Evans DG, Ramsden RT, Shenton A, et al. Mosaicism in neurofibromatosis type 2: an update of risk based on uni/bilaterality of vestibular schwannoma at presentation and sensitive mutation analysis including multiple ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet.* 2007; 44(7): 424–428, doi: 10.1136/jmg.2006.047753, indexed in Pubmed: 17307835.
 37. Evans DG, Sainio M, Baser ME. Neurofibromatosis type 2. *J Med Genet.* 2000; 37(12): 897–904, doi: 10.1136/jmg.37.12.897, indexed in Pubmed: 11106352.
 38. Evans DGR, Baser ME, O'Reilly B, et al. Management of the patient and family with neurofibromatosis 2: a consensus conference statement. *Br J Neurosurg.* 2005; 19(1): 5–12, doi: 10.1080/02688690500081206, indexed in Pubmed: 16147576.
 39. Selvanathan SK, Shenton A, Ferner R, et al. Further genotype–phenotype correlations in neurofibromatosis 2. *Clin Genet.* 2010; 77(2): 163–170, doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01315.x, indexed in Pubmed: 19968670.
 40. Evans DG. Neurofibromatosis 2. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. ed. *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle 1993–2021.
 41. Denayer E, Legius E. Legius Syndrome and its Relationship with Neurofibromatosis Type 1. *Acta Dermato Venereologica.* 2020; 100(7): adv00093–167, doi: 10.2340/00015555-3429.
 42. Brems H, Chmara M, Sahbatou M, et al. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nat Genet.* 2007; 39(9): 1120–1126, doi: 10.1038/ng2113, indexed in Pubmed: 17704776.