

## **PATOLOGIA MOLECULAR DE LA NEUROFIBROMATOSI DE TIPUS 1**

CONXI LÁZARO, EDUARD SERRA, ELISABET ARS I XAVIER ESTIVILL

*Grup de recerca de neurofibromatosi. Centre de Genètica Mèdica i Molecular - IRO.  
Hospital Duran i Reynals.*

Adreça per a la correspondència: Autovia de Castelldefels, km 2,7. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. Spain. Tel.: 93 260 77 75. Fax: 93 260 77 76.

Adreça electrònica: *clazaro@iro.es*.

### **RESUM**

La neurofibromatosi de tipus 1 (NF1) és una de les malalties hereditàries autosòmiques dominants més freqüents, amb una prevalença aproximada d'un de cada 3.500 nounats. És una malaltia multisistèmica que afecta principalment el sistema nerviós i la pell. L'expressió clínica de la malaltia és molt variable, fins i tot entre els membres amb NF1 d'una mateixa família. El gen d'aquesta malaltia mapa a la regió centromèrica del cromosoma 17, va ser aïllat per clonatge posicional el 1990 i té una elevada taxa de mutació. Es considera que aproximadament un 50 % dels pacients representen casos esporàdics de la malaltia. L'espectre mutacional d'aquest gen és molt ampli i la majoria de mutacions són úniques, cosa que dificulta el diagnòstic directe i el consell genètic de la malaltia. Solament s'ha identificat un domini funcional pel producte gènic de *NF1*, la neurofibromina, denominat GRD (*GAP related domain*: domini amb homologia per a les proteïnes activadores de GTPases). La neurofibromina formaria part de la família de les proteïnes GAP específiques de Ras i controlaria els nivells de Ras actiu, unit a GTP. Aquesta funció de la neurofibromina, juntament amb el fet que el gen *NF1* s'ha trobat inactivat en molts tipus tumorals, fa que *NF1* es consideri un gen supressor de tumors. Recentment també s'ha descrit que la neurofibromina participa en les vies de transducció de senyal associades a cAMP. El nostre grup de recerca està implicat en l'estudi geneticomolecular de les neurofibromatosis des de 1989. En aquest treball es revisen els aspectes clínics, genètics, patològics i moleculars de la NF1, i es planteja la situació del consell genètic i el diagnòstic prenatal en aquesta malaltia.

## INTRODUCCIÓ

La neurofibromatosi de tipus 1 (NF1) és una malaltia multisistèmica que afecta principalment el sistema nerviós i la pell. És una malaltia hereditària, monogènica, que es transmet seguint un patró autosòmic dominant. La seva incidència s'estima en un de cada 3.500 naixements (Crowe *et al.*, 1956; Sergejev, 1975; Samuelsson i Axelsson, 1981; Huson *et al.*, 1989). L'expressió clínica de la malaltia és heterogènica i altament variable, fins i tot entre els membres afectats d'una mateixa família. Actualment no existeix cap tractament etiològic per a cap de les alteracions clíniques de la neurofibromatosi.

## ANTECEDENTS HISTÒRICS

En la literatura mèdica dels segles passats hi ha diverses descripcions de casos de pacients amb característiques clares de presentar NF1. Tot i que alguns autors havien destacat l'aparició de tumors a la pell i havien descrit la natura familiar de la malaltia, va ser Friedrich von Recklinghausen, el 1882, qui va donar una descripció completa de la NF1. És per aquest motiu que la NF1 també es coneix com a malaltia de von Recklinghausen. La definició d'aquesta malaltia com a hereditària, amb un patró autosòmic dominant, no es va fer fins al començament del segle XX (Preiser i Davenport, 1918). Durant molts anys es va pensar que Joseph Merrick, l'home elefant, patia aquesta malaltia. Actualment és reconegut que en realitat es tractava d'un cas de síndrome de Proteus. Tanmateix, aquest fet ha permès que algunes de les característiques clíniques de la NF1 siguin conegudes per gran part de la població a través del cinema, teatre o televisió. D'altra banda, aquest error ha causat greus preocupacions a moltes famílies amb NF1 sobre el seu futur aspecte físic. Normal-

ment, els especialistes no acostumen a descriure formes clíniques de NF1 amb unes característiques semblants a les de Joseph Merrick.

## ASPECTES CLÍNICS DE LA NF1

### criteris diagnòstics

El terme neurofibromatosi (NF) inclou diferents condicions nosològicament relacionades a causa de l'existència de coincidència entre algunes manifestacions clíniques. Actualment es poden distingir de manera clara dos tipus de neurofibromatosi: la NF1 (o de von Recklinghausen) i la NF2 (neurofibromatosi central o bilateral acústica). Ambdues tenen un patró d'herència autosòmic dominant i es consideren dues entitats completament diferents, tant des del punt de vista clínic com genètic.

El 1987, l'NIH (National Institutes of Health) va establir els criteris diagnòstics per a la NF1 (taula 1). Les característiques clíniques majoritàries que es poden apreciar externament en pacients amb NF1 són les

TAULA 1. Criteris diagnòstics per a la NF1

| <b>Dos o més dels següents</b>   |
|--|
| • Sis o més taques café amb llet<br>1,5 cm o més després de la pubertat<br>0,5 cm o més abans de la pubertat |
| • Dos o més neurofibromes de qualsevol tipus o un o més neurofibromes plexiformes                            |
| • Efèlides axil·lars   |
| • Glioma òptic   |
| • Dos o més nòduls de Lisch  |
| • Lesió òssia característica<br>Displàsia de l'esfenoides<br>Displàsia cortical d'ossos llargs               |
| • Familiar de primer grau amb NF1  |

taques café amb llet i els neurofibromes. Les taques café amb llet són màcules planes i pigmentades de forma homogènia, solen estar presents des del naixement i l'existència de sis o més és altament indicativa de NF1. Existeixen altres entitats clíniques que cursen solament amb la presència de taques café amb llet i mostren una herència autosòmica dominant, però encara no s'ha descrit cap gen que hi estigui lligat.

Els neurofibromes són lesions tumorals benignes formades per diferents tipus cel·lulars (cèl·lules de Schwann, fibroblasts i mastòcits, entre d'altres) i elements vasculars. S'ha descrit un increment d'aquests neurofibromes durant l'adolescència i en l'embaràs. També s'ha descrit que cap als quaranta anys tots els pacients amb NF1 n'acaben tenint algun (Riccardi i Eichner, 1992). No existeix una edat determinada per a l'aparició dels diferents signes que caracteritzen la malaltia, però es considera que un pacient amb NF1 ha de complir els criteris diagnòstics a l'edat de cinc anys.

### Complicacions observades en la NF1

Els criteris diagnòstics que es mostren a la taula 1 es troben a la majoria dels pacients que presenten NF1. Tot i tenir una gran importància estètica, principalment a causa del creixement dels neurofibromes, aquests no representen cap amenaça per a la vida dels pacients. Ara bé, existeixen certes complicacions associades a la NF1 que poden ser més serioses i afectar l'esperança de vida dels individus que les presenten. Aproximadament una tercera part dels pacients amb NF1 poden patir una o més de les complicacions següents: problemes d'aprenentatge, neurofibromes plexiformes, tumors malignes, convulsions, escoliosi, pseudoartrosi, entre d'altres (Riccardi i Eichner, 1992).

### ASPECTES GENÈTICS DE LA NF1

Preiser i Davenport (1918) van ser els primers que van concloure que aproximadament el 50 % dels descendents d'individus afectats amb NF1 també presentaven la malaltia, independentment del seu sexe. Per tant, es tractava d'una malaltia hereditària amb un patró autosòmic dominant.

### Taxa de mutació i eficàcia biològica

D'un 30 % a un 50 % dels pacients amb NF1 no tenen cap progenitor amb la malaltia (Crowe *et al.*, 1956; Samuelsson i Axelson, 1981; Huson *et al.*, 1989), és a dir, representen mutacions *de novo* en el gen *NF1*. Per tant, la taxa de mutació per aquest *locus* s'estableix en  $10^{-4}$  per al·lel i per generació; és una de les taxes de mutació més altes descrites per a una malaltia genètica humana.

Existeixen dades de lligament genètic en trenta famílies NF1 on es descriu que aproximadament el 90 % de mutacions *de novo* s'esdevenen a l'al·lel patern (Jadayel *et al.*, 1990; Stephens *et al.*, 1992; Elyakim *et al.*, 1994), cosa que indica que la majoria de mutacions *NF1* succeeixen durant l'espermatogènesi. D'altra banda, s'ha descrit un biaix important en els mecanismes de mutació, segons si aquesta es dona a la línia germinal femenina o masculina. Així, s'ha descrit que la majoria de mutacions *NF1 de novo* són puntuals i esdevenen a la línia paterna, però quan les mutacions passen a la línia materna, aquestes solen ésser delecions (Lázaro *et al.*, 1996).

Amb aquesta taxa de mutació tan elevada pot predir-se que l'eficàcia biològica dels individus amb neurofibromatosi ha d'estar reduïda de forma significativa per tal que la malaltia estigui present en una freqüència d'equilibri. L'estudi realitzat per Huson *et al.* (1989) va trobar una eficàcia biològica de 0,31 per als homes afectats i de 0,60 per a les

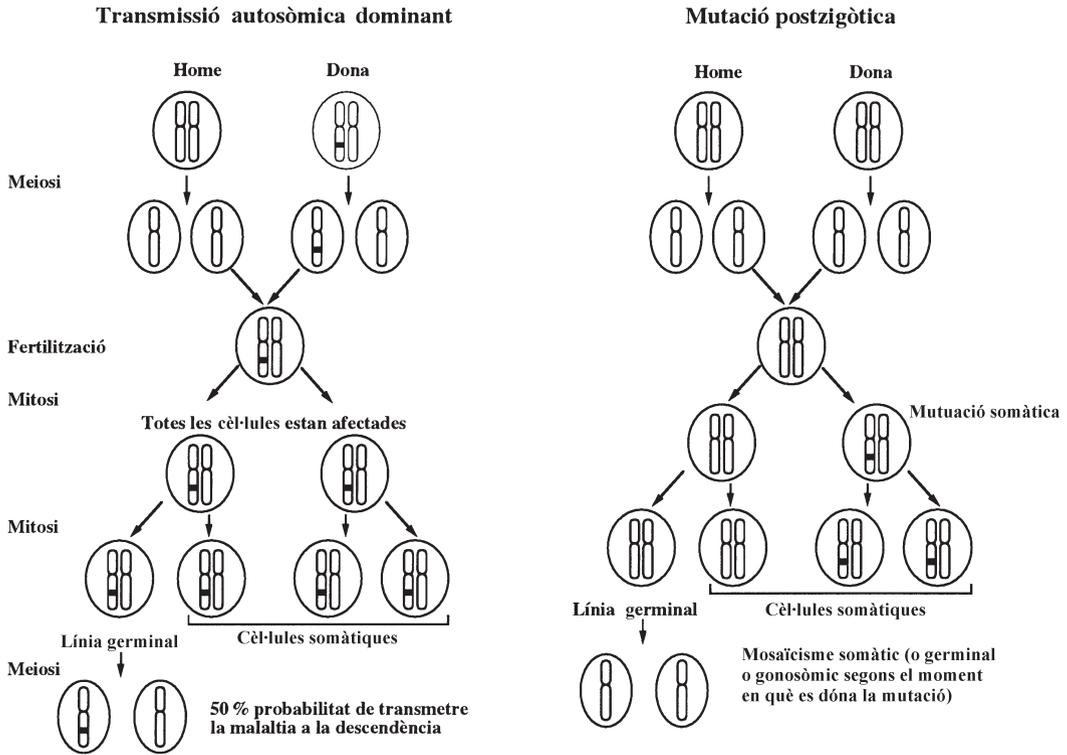


FIGURA 1. Comparació entre una herència típicament mendeliana autosòmica dominant (esquema de l'esquerra) i mosaïcisme genètic (esquema de la dreta). La barra negra al cromosoma indica la presència d'un gen mutat. En l'herència dominant observem que la mutació és a totes les cèl·lules de l'individu i en un 50 % dels gàmetes. Per tant, el risc de transmetre la malaltia produïda després a la descendència és de 1/2. En canvi, a la dreta observem com una mutació produïda després de la fecundació donarà lloc a un individu que presentarà un mosaïcisme genètic. Aquesta mutació es podrà transmetre o no a la següent generació segons el moment en què s'hagi donat (és a dir, abans o després de la determinació de la línia germinal) (Bernards i Gussella, 1994).

dones. Un alt percentatge de la menor eficàcia biològica d'aquests individus por ésser causat per la dificultat que tenen per trobar parella, reflex de les conseqüències psicossocials de la malaltia.

### Mosaïcisme

Des del punt de vista genètic parlem de mosaïcisme quan en un individu coexisteixen poblacions de cèl·lules amb diferent genotip (per exemple, quan existeix una proporció de cèl·lules amb una mutació per una

malaltia genètica i una altra proporció sense la mutació) (figura 1). Les mutacions poden succeir en qualsevol moment del desenvolupament. Segons en quin estadi del desenvolupament es doni la mutació, classifiquem els mosaïcismes en tres tipus. El *mosaïcisme gonosòmic*, que afecta les línies germinal i somàtica; el *mosaïcisme germinal*, que només afecta la línia germinal, i el *mosaïcisme somàtic*, que només afecta la línia somàtica. A la NF1 s'han descrit tres famílies corresponents a genealogies amb més d'un fill afectat i els pares fenotípicament normals (Riccardi i Lewis, 1988; Lázaro *et al.*, 1994a).

Aquests casos podrien correspondre a mosaïcismes germinals; només en una d'aquestes famílies s'ha pogut demostrar molecularment aquest mosaïcisme (Lázaro *et al.*, 1994a). També s'han descrit algunes famílies on un dels pares sembla tenir una expressió limitada del gen *NF1* (Riccardi i Lewis, 1988; Huson i Hughes, 1994). Els pares, en aquests casos, probablement són exemples de mosaïcisme gonosòmic pel gen *NF1*.

### Penetració i expressivitat

La penetració de la NF1 es considera del 100 % en individus amb més de cinc anys que han estat examinats detingudament per un expert en la malaltia. L'expressivitat d'aquesta malaltia és molt variable, fins i tot entre els membres afectats d'una mateixa família. És a dir, que la mateixa mutació germinal al *locus NF1* no dona el mateix fenotip en els diferents individus que la presenten. Amb la finalitat de distingir entre les influències genètiques i les ambientals es va fer un estudi de bessons monozigòtics amb NF1, i es van comparar amb parelles de familiars de primer grau amb la malaltia (Easton *et al.*, 1993). L'estudi demostra que hi ha una correlació entre el nombre de taques cafè amb llet i neurofibromes entre bessons monozigòtics, també entre familiars de primer grau, i que quasi no existeix correlació entre familiars més llunyans. Aquests resultats suggereixen que aquestes característiques estan controlades per altres gens menors, i que la mutació específica al gen *NF1* tindria un paper director (gen major). Aquest mateix estudi (Easton *et al.*, 1993) mostra que els gliomes òptics, l'epilèpsia, l'escoliosi i els problemes d'aprenentatge concordaven en els bessons, però no els neurofibromes plexiformes. Tampoc no es va veure que la presència d'una complicació predigués l'aparició d'una altra, excepte per als neurofibrosarcomes, que solen

aparèixer exclusivament en individus que tenen neurofibromes plexiformes.

## ASPECTES MOLECULARS DE LA NF1

### Clonatge del gen *NF1*

El 1987 els estudis de lligament genètic designaren la regió pericentromèrica del cromosoma 17 com la regió on es localitzava el gen responsable de la neurofibromatosis de tipus 1 (Barker *et al.*, 1987; Diehl *et al.*, 1987; Seizinger *et al.*, 1987; Skolnick *et al.*, 1987). El descobriment de dos pacients amb translocacions en aquesta zona va accelerar el procés de localització física del gen *NF1*, ja que va delimitar més la regió d'interès (Schmidt *et al.*, 1987; Menon *et al.*, 1989; Ledbetter *et al.*, 1989; O'Connell *et al.*, 1989). En aquest punt es va procedir a l'aïllament de cDNA d'aquesta regió. El primer candidat va ser l'homòleg humà (*EVI2A*) del gen *evi2* (*ecotropic viral integration site 2A*) de ratolí, involucrat en els processos de leucèmies murines induïdes víricament. El segon candidat va ésser *EVI2B*, de funció similar a *EVI2A*. El tercer gen candidat va ser el gen *OMgP* (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*); es va considerar de gran importància ja que la seva expressió era quasi exclusiva dels oligodendròcits. Cap d'aquests gens va complir criteris per ser responsable de la NF1, ja que no es van trobar mutacions en aquests gens en els pacients amb la malaltia i no estaven alterats per les translocacions abans esmentades. Finalment, el quart gen candidat clonat en aquesta regió va ser el gen responsable de la NF1 (figura 2). Primerament es va veure que aquest gen era interromput per les dues translocacions anteriorment esmentades i, a més, es van identificar mutacions en diversos pacients amb neurofibromatosis 1 (Cawthon *et al.*, 1990; Viskochil *et al.*, 1990; Wallace *et al.*, 1990).

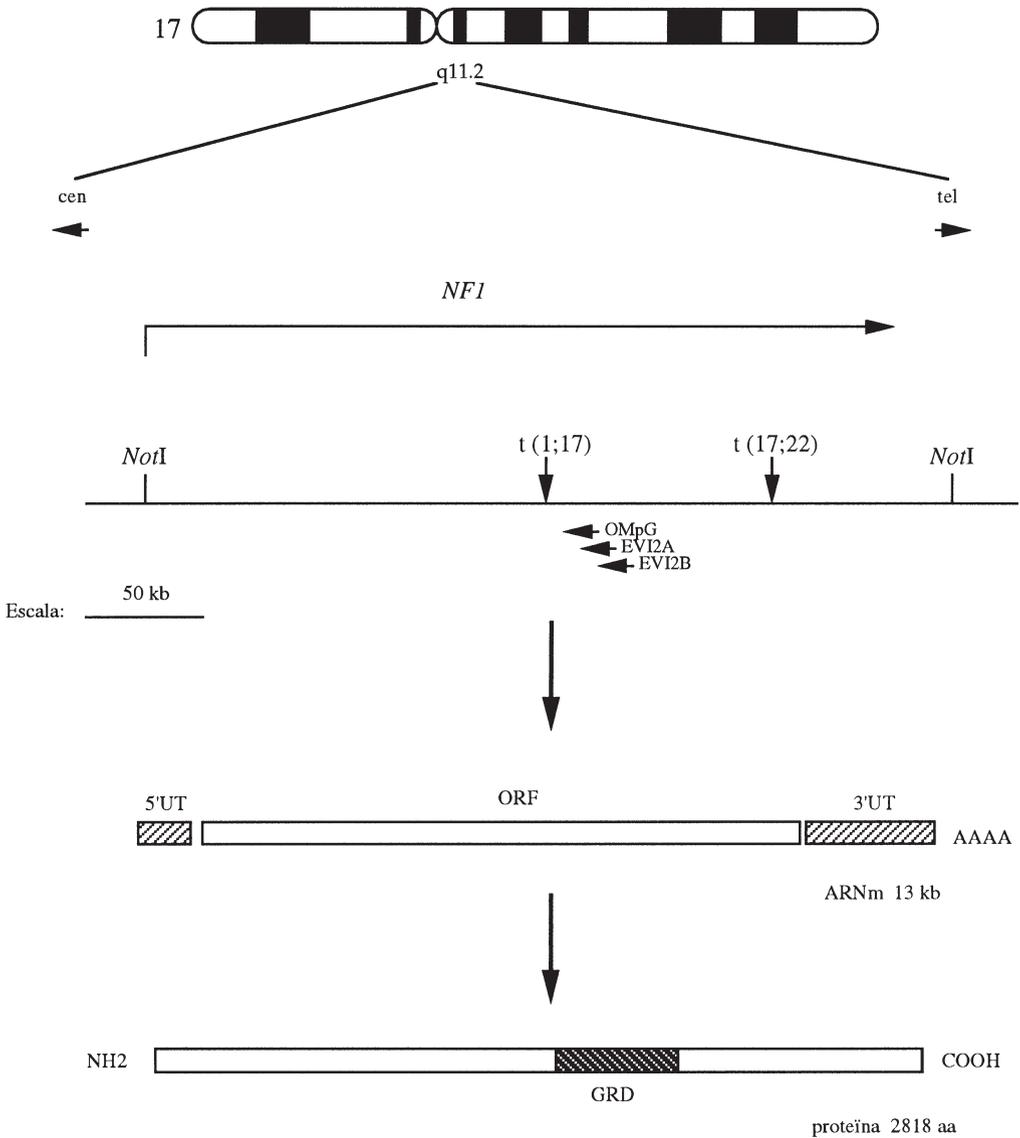


FIGURA2. Organització genètica del locus *NF1*. 5'UT/3'UT: regions no traduïdes situades a 5' i 3' del gen *NF1*. GRD: *GAP related domain*.

### Estructura del gen *NF1*

L'extrem 5' del gen *NF1* es troba en una illa CpG que conté un lloc de restricció *NotI*, i la resta del gen és en el fragment *NotI* adjacent de 350 kb (Li *et al.*, 1995). El gen *NF1* té

una pauta de lectura oberta de quasi 9 kb (Marchuk *et al.*, 1991) (figura 2). L'RNA missatger (mRNA) està estimat entre 11-13 kb i s'ha detectat en tots els teixits examinats per RT-PCR (Wallace *et al.*, 1990). Actualment sembla que ja s'ha determinat el

nombre total d'exons: seixanta, inclosos alguns exons alternatius (Danglot *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995), tot i que la seva estructura genòmica completa encara no ha estat caracteritzada.

La comparació de la regió promotora i del segment 3' no traduït del gen *NF1* entre humans i ratolins ha evidenciat un alt grau d'identitat de seqüència, la qual cosa suggereix que aquestes regions també poden ser dianes de mutació en els pacients *NF1* (Bernards *et al.*, 1993). En la regió promotora no s'han identificat seqüències TATA o CCAAT, però s'han detectat diversos motius per la unió de factors de transcripció, entre els quals un element de resposta a cAMP (CRE), diversos llocs *consensus* AP2 i un element de resposta a sèrum. L'alta conservació d'aquestes seqüències indica que poden ser importants en la regulació de l'expressió del gen *NF1* (Hajra *et al.*, 1994).

S'han trobat diversos pseudogens de *NF1* localitzats en els cromosomes 14 i 22 (Marchuk *et al.*, 1992), 15 (Legius *et al.*, 1992), 2, 12, 20 i 21 (Cummings *et al.*, 1996). S'ha postulat que algunes de les mutacions *NF1* podrien ser causades per fenòmens de conversió gènica entre aquests pseudogens i el gen *NF1* (Legius *et al.*, 1992; Marchuk *et al.*, 1992).

Els tres primers gens identificats durant el clonatge del gen *NF1* (*EVI2A*, *EVI2B* i *OMgP*) estan dintre de l'intró 27b, de més de 40 kb, i es transcriuen en direcció contrària al gen *NF1* (Cawthon *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1990a). Un fet interessant és que els homòlegs murins dels gens *EVI2A* i *EVI2B* estan implicats en tumors mieloides en ratolins, tot i que el seu mecanisme d'actuació encara no és clar. Aquest fet podria tenir relació amb el risc més elevat de leucèmia mieloide juvenil en els pacients amb *NF1* (Clark, 1982; Shannon *et al.*, 1994; Largaespada *et al.*, 1996b). *OMgP* codifica per la glicoproteïna mielinitzant d'oligodendròcits, que s'ex-

pressa únicament en oligodendròcits del sistema nerviós central. *OMgP* podria funcionar com una molècula d'adhesió cel·lular en la mielina del sistema nerviós central (Mikol *et al.*, 1990). S'han descrit pacients amb *NF1* i esclerosi múltiple. L'esclerosi múltiple és una malaltia en la qual es donen múltiples plaques de desmielinització en el sistema nerviós central (Dick, 1992). S'ha hipotetitzat que pacients amb *NF1* i esclerosi múltiple tindrien una mutació que alteraria tant el gen *NF1* com l'*OMgP*, la qual cosa donaria lloc a aquest fenotip amb presentació d'ambdues malalties (Shen *et al.*, 1996).

El producte del gen *NF1*, la neurofibromina, té un domini central amb similitud de seqüència amb la família de proteïnes activadores de GTPases (GAP), les quals regulen negativament p21<sup>ras</sup> (Ballester *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1990a, 1990b). A més, la identificació de mutacions somàtiques en el gen *NF1* en diversos tumors relacionats o no amb la *NF1* (Li *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 1993a; Legius *et al.*, 1993; The *et al.*, 1993; Shannon *et al.*, 1994; Colman *et al.*, 1995; Sawada *et al.*, 1996; Serra *et al.*, 1997) confirma que el gen *NF1* és un supressor de tumors.

### Anàlisi de mutacions germinals

Tot i que fa més de vuit anys que es va clonar el gen *NF1*, l'anàlisi de mutacions en pacients amb neurofibromatosis no ha resultat gaire eficient. Diverses raons podrien explicar l'escassetat de mutacions detectades: la gran mida del gen (seixanta exons en unes 350 kb de DNA genòmic), l'existència de pseudogens en diferents cromosomes, la possibilitat d'acumulació de mutacions en regions no codificants o la possible existència d'un mecanisme mutacional encara desconegut.

Actualment s'han descrit 241 mutacions

TAULA 2. Quadre resum de les mutacions germinals detectades en el gen *NF1* segons dades del NNFF International NF1 Mutation Analysis Consortium (novembre 1997)

| Tipus de mutació           | Nombre     | %          |
|----------------------------|------------|------------|
| Reordenament cromosòmic    | 4          | 1,7        |
| Delecions del gen sencer   | 26         | 10,7       |
| Deleció de múltiples exons | 37         | 15,4       |
| Petites delecions          | 53         | 22,0       |
| Petites insercions         | 28         | 11,6       |
| Mutacions d'aturada        | 42         | 17,4       |
| Canvi d'aminoàcid          | 23         | 9,5        |
| Mutacions a introns        | 24         | 10,0       |
| Mutacions a 3'UTR          | 4          | 1,7        |
| <b>Total</b>               | <b>241</b> | <b>100</b> |

en el gen *NF1* que es poden classificar en nou grups (taula 2). La majoria de mutacions *NF1* són úniques i han estat trobades només en una família. Tanmateix, onze pacients *NF1* no relacionats i de diferents països presenten la mateixa mutació d'aturada, R1947X, a l'exó 31 (Cawthon *et al.*, 1990; Estivill *et al.*, 1991; Ainsworth *et al.*, 1993; Horiuchi *et al.*, 1994; Valero *et al.*, 1994; Lázaro *et al.*, 1995b). Aquesta és la mutació que presenta una recurrència més elevada, que s'ha estimat en un 2 % dels cromosomes *NF1* estudiats. Aquesta mutació involucra un dinucleòtid CpG, el qual presenta una alta taxa de mutació en el genoma humà deguda a la desaminació espontània de citosina cap a timidina (Cooper i Youssoufian, 1988). També s'han detectat altres mutacions amb una recurrència menor, presents com a màxim a entre dos i quatre cromosomes *NF1* independents (NNFF International NF1 Mutation Analysis Consortium).

Fins al moment, sembla que les mutacions *NF1* es distribueixen uniformement al llarg del gen, tot i que s'ha hipotetitzat que l'exó 37 podria ser un focus de mutació, ja que s'han identificat vint mutacions independents en una seqüència contigua de 49 pb d'aquest exó, en aproximadament sis-

cents individus *NF1* analitzats (Robinson *et al.*, 1995; Böddrich *et al.*, 1997; Messiaen *et al.*, 1997; Hoffmeyer *et al.*, 1998). Recentment, també s'han descrit mutacions d'aturada dins els exons 7 i 37 que donen lloc a l'*skipping* o salt de l'exó que presenta la mutació. L'eliminació d'aquests exons no comporta un canvi en la pauta de lectura i, per tant, es prediu que no donarà lloc a una proteïna truncada, ja que s'ha eliminat l'exó portador de la mutació d'aturada (Messiaen *et al.*, 1997; Hoffmeyer *et al.*, 1998). Càlculs d'energia lliure mínima de les estructures secundàries d'aquests dos exons en presència de la mutació d'aturada han mostrat importants diferències entre l'exó mutat i el salvatge. Per tant, aquests canvis en l'estructura secundària podrien ser els responsables de salt de l'exó. Per altra banda, algunes de les mutacions d'aturada poden donar lloc a la creació o disrupció de seqüències exòniques rellevants per al procés de tall i unió, que podrien ser la causa d'aquests fenòmens de salt (Hoffmeyer *et al.*, 1998).

La cerca de mutacions en el gen *NF1* s'ha realitzat amb totes les tècniques que normalment s'utilitzen amb aquesta finalitat. Actualment, la tendència és emprar tècniques basades en l'anàlisi de l'mRNA (RNA-SSCP, RNA-heterodúplex) (Gasparini *et al.*, 1996; Ars *et al.*, manuscrit en preparació) i de la proteïna (anàlisi de la proteïna truncada) (Heim *et al.*, 1994 i 1995), que obvien l'estudi de les regions no codificants i per tant permeten una anàlisi més ràpida de la regió codificant.

La majoria (60 %-70 %) de les mutacions en el gen *NF1*, reportades a l'NNFF International NF1 Genetic Analysis Consortium (Korf, 1997), són mutacions que donen lloc a una proteïna truncada, entre les quals s'inclouen: delecions de múltiples exons, petites delecions, petites insercions i mutacions d'aturada (taula 2). Aquestes mutacions haurien de donar lloc a una proteïna més curta, que fins al moment no s'ha pogut detectar

mitjançant transferència *Western*. Aproximadament un 25 % del total de mutacions reportades són delecions del gen sencer o de múltiples exons. Probablement aquest alt percentatge reportat es degui a un biaix per la facilitat per detectar aquest tipus de mutacions. De fet, els estudis realitzats en sèries grans de pacients NF1 conclouen que les delecions grans estan presents en només el 5 % dels casos de NF1 (Lázaro *et al.* 1993 i 1996).

### Correlació genotip-fenotip a la NF1

L'escassetat de mutacions detectades en la NF1 fa que sigui difícil correlacionar la localització i el tipus de mutació amb les característiques clíniques variables de la malaltia. A més, la variabilitat fenotípica intrafamiliar fa aquesta correlació encara més difícil.

L'única correlació genotip-fenotip descrita associa delecions que eliminen tot el gen amb retard mental i/o dificultats en l'aprenentatge, lleugeres deformacions facials i un gran nombre de neurofibromes cutanis d'aparició primerenca (Kayes *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995; Leppig *et al.*, 1996; Upadhyaya *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997).

El treball d'Easton *et al.* (1993) prediu que en la NF1 la correlació fenotip-genotip no serà fàcil a causa del paper important que semblen tenir els gens modificadors. La identificació d'aquests gens modificadors requerirà estudis de mapatge genètic en grups de famílies que presentin alteracions fenotípiques determinades en estudis de concordança i discordança per un o diversos trets de la malaltia.

### PROCESSAMENT DE L'RNA DE NF1

L'expressió del gen *NF1* és força complexa; és modulada posttranscripcionalment

per diversos esdeveniments de *splicing* alternatiu i *RNA editing* en resposta a un gran nombre de factors intrínsecs i extrínsecs. Tots aquests mecanismes, en conjunt, poden actuar regulant els nivells intracel·lulars de neurofibromina, modulant l'activitat suppressora tumoral d'aquesta o expressant selectivament altres isoformes, les funcions de les quals encara no es coneixen.

### Processament alternatiu de l'mRNA

L'expressió del gen *NF1* dona lloc a múltiples transcrits alternatius (Marchuk *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1991; Nishi *et al.*, 1991; Kyritsis *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 1993b; Mantani *et al.*, 1994; Danglot *et al.*, 1995), deguts a l'existència de diferents *splicing* alternatius (taula 3). D'aquests, els transcrits tipus I i tipus II són els millor caracteritzats i difereixen en la inclusió o exclusió d'un exó addicional, l'exó 23a, localitzat dins del GRD (*GAP related domain*). El transcrit tipus I, l'mRNA *NF1* originalment identificat, no conté aquest exó. El transcrit tipus II inclou l'exó 23a, de 63 pb, el qual introdueix vint-i-un aminoàcids addicionals a la proteïna (Nishi *et al.*, 1991). Aquest transcrit tipus II s'anomena GRD II (*GAP-related domain II*) i es troba en diverses espècies (humà, ratolí, rata i pollastre). Estudis d'expressió d'aquesta isoforma en llevat demostren que té activitat GAP, però que la seva capacitat per regular Ras està reduïda (veure apartat proteïna). L'expressió d'aquest transcrit sembla estar regulada de manera teixit específica i estadi de desenvolupament específica. Teixits de cervell normal expressen preferencialment l'mRNA tipus I, mentre que altres teixits examinats expressen ambdós transcrits, tipus I i II. Tanmateix, els tumors cerebrals expressen l'mRNA de tipus II de manera predominant, fet que suggereix que l'expressió pre-

TAULA 3. Transcrits alternatius del gen *NF1*

| Nom transcrit      | Exó Alternatiu     | Teixits expressió                         | Efecte en la neurofibromina                        | Afecta GDR? | Espècies                      |
|--------------------|--------------------|---|--|-------------|-------------------------------|
| 5'ALT2             | 9br                | només SNC, reduïda en tumors cerebrals    | addició de 10 aminoàcids                           | no          | humà, ratolí                  |
| GRD2 o tipus II    | 23a                | tos, incrementada en tumors cerebrals     | addició de 21 aminoàcids                           | sí          | humà, ratolí, rata, pollastre |
| Tipus III (muri)   | 23a i 23b          | glàndules adrenals, ronyó, ovaris         | introducció de canvi de pauta de lectura           | sí          | ratolí, rata                  |
| Tipus IV (muri)    | 23b                | testicles                                 | introducció de canvi de pauta de lectura           | sí          | ratolí, rata                  |
| 3'ALT o Tipus 3    | 48a                | múscul cardíac i esquelètic fetal i adult | addició de 18 aminoàcids                           | no          | humà, ratolí, rata            |
| Tipus 4            | 23a i 48a          | múscul cardíac i esquelètic fetal i adult | addició de 18 aminoàcids al GRD i 18 al C-terminal | sí          | humà, ratolí, rata            |
| 5'ALT1 o N-Isoform | Exclou Exons 11-49 | cervell normal i tumors cerebrals         | Exclou aminoàcids 548-2815                         | sí          | humà                          |

ferencial d'aquesta isoforma pot afectar el creixement de tumors cerebrals (Suzuki *et al.*, 1991).

El tercer transcrit alternatiu, anomenat tipus III, inclou dos exons addicionals dins del GRD: l'exó 23a, idèntic al del GRD II, i l'exó 23b, de 41 bp, el qual dóna lloc a un canvi en la pauta de lectura i conseqüentment introdueix un codó d'aturada dins del GRD (Kyritsis *et al.*, 1992). Aquest transcrit s'expressa en rata i ratolí, però no s'ha pogut detectar en diverses línies cel·lulars humanes estudiades.

S'ha identificat un quart transcrit alternatiu muri, el tipus IV, el qual inclou l'exó 23b però no el 23a (Mantani *et al.*, 1994). Aquest transcrit està present en rata i ratolí. El canvi en la pauta de lectura, degut a la incorporació de l'exó 23b, condueix a un se-

nyal d'aturada al codó 1384 del gen *NF1*. Els nivells d'expressió del transcrits tipus III i tipus IV són substancialment més baixos que els dels transcrits I i II. Els nivells més elevats de transcrit tipus III es detecten a les glàndules adrenals de ratolí, mentre que els nivells més elevats de transcrit tipus IV es detecten als testicles. Cal destacar que mentre els transcrits tipus III i tipus IV codifiquen proteïnes truncades a les quals manca la major part del GRD, la seva habilitat per unir-se a Ras és similar a la de la neurofibromina completa (Mantani *et al.*, 1994). Aquesta observació suggereix que les formes de neurofibromina truncada, que resulten de la traducció dels transcrits tipus III i tipus IV, poden competir d'alguna manera amb la neurofibromina de llargada completa per la unió de Ras. Per tant, actuarien de manera

dominant negativa per regular la conversió de Ras des de la seva forma activa unida a GTP cap a la seva forma inactiva unida a GDP (Skuse i Cappione, 1997).

A més d'aquestes isoformes que difereixen en els seus GRD, s'han identificat altres transcrits que difereixen en altres punts de la regió codificant. Un d'aquests transcrits, anomenat N-isoforma o 5'ALT1 (*5' alternatively spliced exon 1*), té una llargada de només 2,9 kb i li manca tot el domini GRD. Aquest codifica una proteïna de 551 aminoàcids, dels quals 547 són comuns a la resta de transcrits NF1 mentre que els quatre últims, a l'extrem carboxiterminal, són addicionals (Suzuki *et al.*, 1992). L'expressió d'aquest mRNA s'ha detectat tant a cervell normal com a tumors cerebrals, tot i que no s'en coneix la funció (Takahashi *et al.*, 1994).

Un altre *splicing* alternatiu es produeix a l'extrem 3' del gen *NF1* i dona lloc a un altre transcrit que conté un nou exó addicional, l'exó 48a, de 54 nucleòtids (Cawthon *et al.*, 1990; Marchuk *et al.*, 1991). Aquesta isoforma s'anomena 3'ALT (*3' alternatively spliced exon*) i es va detectar originàriament en una llibreria de cDNA de cervell fetal (DeClue *et al.*, 1991). Estudis d'aquesta isoforma per RT-PCR han demostrat una expressió molt alta en múscul cardíac, esquelètic i llis, i nivells d'expressió residuals en nervi i cervell. Aquesta isoforma també s'expressa en teixits musculars d'altres espècies vertebrades. L'expressió d'aquesta isoforma en múscul suggereix que el gen *NF1* pot tenir papers addicionals teixitespecífics en el desenvolupament del múscul i en la transducció de senyal en aquest teixit (Gutmann *et al.*, 1993). Transcrits que contenen l'exó 48a però no el 23a s'anomenen tipus 3, mentre que els que contenen tots dos s'anomenen tipus 4. Aquesta observació d'especificitat de teixit és inesperada per la manca de patologia muscular en els pacients NF1. Tanmateix, la presència d'anormalitats car-

díaques en ratolins *knockout* homozigots pel gen *NF1* suggereixen que l'expressió del gen *NF1* és necessària per al desenvolupament correcte del múscul cardíac (Brannan *et al.*, 1994; Jacks *et al.*, 1994), i podria ser particularment necessària l'expressió del transcrit *NF1* que conté l'exó 48a.

Finalment, s'ha identificat un transcrit alternatiu que conté un exó addicional entre els exons 9 i 10a, l'exó 9br, que dona lloc a la inserció de deu aminoàcids entre els residus 420 i 421 de la neurofibromina. Aquest s'ha anomenat 5'ALT2 (*5' alternatively spliced exon 2*). L'expressió d'aquest mRNA està conservada en ratolí, la qual cosa suggereix que la seva funció, encara desconeguda, deu ser important. Aquest transcrit s'expressa a alts nivells al sistema nerviós central, a nivells reduïts en tumors cerebrals i està absent en la resta de teixits no tumorals (Danglot *et al.*, 1995). El patró d'expressió teixitespecífic i dependent de l'estadi de desenvolupament dels transcrits murins que contenen aquest exó alternatiu suggereix que deu tenir un paper en la diferenciació i desenvolupament del sistema nerviós central (Geist i Gutmann, 1996).

### Expressió al·lèlica desigual

A més de la regulació de l'expressió del gen *NF1* mitjançant fenòmens de *splicing* alternatiu, s'ha descrit una altra possibilitat de regulació basada en l'expressió desigual dels al·lèls *NF1*. Utilitzant un polimorfisme present a l'exó 5 d'aquest gen, es va analitzar l'expressió dels seus al·lèls per RT-PCR quantitativa d'aquest exó preparat a partir de l'RNA total. Es van analitzar fibroblasts en cultiu de quinze pacients NF1 i de limfòcits de sang perifèrica d'un pacient NF1, tots ells heterozigots per aquest polimorfisme (Hoffmeyer *et al.*, 1995). En un 80 % dels pacients es van detectar nivells variables d'ex-

pressió al·lèlica que oscil·laven des de 0,1 fins a 26,8, expressats com a relació d'un al·lel respecte de l'altre. Anàlisis similars amb RNA d'individus control detectaven relacions al·lèliques que variaven de 1,0 a 1,4, la qual cosa determina que els missatgers al·lèlics estaven igualment representats en l'RNA d'aquests individus sans. Quan aquests estudis es realitzaven a partir de RNA nuclear, es trobaven nivells iguals dels transcrits primaris. Aquests resultats indiquen que l'expressió desigual en els nivells de mRNA devia resultar d'esdeveniments citoplasmàtics, tals com diferències d'estabilitat de l'mRNA madur en el compartiment extranuclear o transport diferencial des del nucli cap al citoplasma, més que d'un processament nuclear diferencial dels transcrits al·lèlics. Cal destacar que en aquest mateix estudi es van analitzar els nivells de mRNA de tres mutacions d'aturada i només una d'elles donava lloc a una expressió desigual, mentre que les altres dues donaven lloc a nivells equivalents als de mRNA de l'al·lel normal, cosa que està en contradicció amb els resultats d'altres grups en altres malalties (McIntosh *et al.*, 1993).

### Correcció (*editing*) del mRNA NF1

L'*editing* és un mecanisme de processament posttranscripcional mitjançant el qual s'introdueixen canvis a la seqüència codificant de l'mRNA que no estaven predeterminats a la seqüència codificant de DNA. En aquest sentit, la correcció del mRNA pot ser considerat un altre nivell de regulació de l'expressió gènica i que a més contribueix a la diversitat proteica. El mRNA *NF1* està sotmès a un procés de correcció pel qual es modifica una citosina d'un codó d'arginina (CGA), al nucleòtid 3916 de l'exó 23-1, per una uridina (UGA) i dona lloc a la creació d'un codó d'aturada (Skuse *et al.*, 1996).

L'expressió de l'mRNA *NF1* modificat pel procés de correcció pot donar lloc a una proteïna truncada a la regió N-terminal del domini GRD, o a un mRNA inestable per la presència de la mutació d'aturada (Peltz *et al.*, 1991 i 1992). Tot i que encara no s'ha determinat quina d'aquestes dues alternatives té lloc, en qualsevol cas es produirà la inactivació de l'activitat supressora tumoral sense involucrar mutacions en el propi gen *NF1*.

S'ha detectat correcció de l'mRNA *NF1* en tots el tipus cel·lulars estudiats fins al moment. Per tal d'analitzar el paper d'aquest mecanisme en la tumorigènesi associada a la *NF1*, es va realitzar un estudi inicial en dinou tumors obtinguts de pacients *NF1* i quatre tumors no *NF1*, el qual va demostrar la presència de nivells variables de correcció en diferents tumors, amb nivells més elevats en els tumors més malignes, com neurofibrosarcomes, en comparació amb tumors benignes, com neurofibromes cutanis. També es va comparar la correcció de teixit tumoral i no tumoral de diversos pacients *NF1* i en tots els casos es van detectar nivells més elevats en teixit tumoral que en teixit normal (Cappione *et al.*, 1997). Posteriors estudis realitzats pel mateix grup d'investigadors suggereixen que la correcció en els tumors *NF1* pot ser un fenomen no consistent. En analitzar deu tumors addicionals, han detectat nivells de correcció iguals o més baixos que els observats en teixits no tumorals (Skuse i Cappione, 1997). Per tant, fins al moment no s'ha aclarit el paper d'aquest mecanisme en la tumorigènesi.

## EL PRODUCTE DEL GEN *NF1*: LA NEUROFIBROMINA

### Les proteïnes Ras i les seves GAP

Les proteïnes Ras, els productes dels gens *H-*, *K-* i *N-Ras*, són reguladores centrals

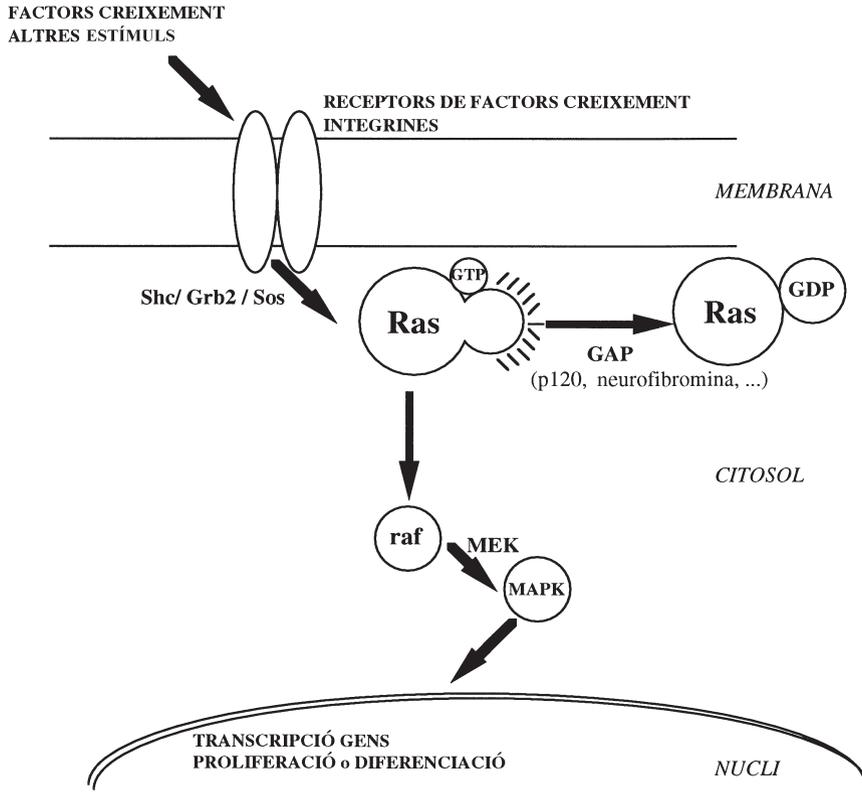


FIGURA 3. Esquema simplificat del senyal de transducció de la MAP quinasa mitjançat per Ras, on es mostra on actuaria la neurofibromina.

dels processos de transducció de senyal cel·lulars, i són essencials per controlar el creixement i la diferenciació cel·lular. Aquestes proteïnes es poden considerar interruptors moleculars que en les cèl·lules en repòs estan en forma inactiva, unides a GDP. En resposta a receptors amb activitat tirosina quinasa o altres estímuls dependents de factors de creixement, les proteïnes Ras esdevenen activades per la unió a GTP (figura 3). En la cèl·lula, l'estat conformacional d'aquestes proteïnes està regulat per la interacció amb dos tipus de proteïnes, factors bes-canviadors de nucleòtids guanina (GEF) i proteïnes activadores de GTPases (GAP) (Boguski i McCormick, 1993). Les GEF pro-

mouen la unió de Ras a GTP. Una vegada actives, les proteïnes Ras poden interactuar amb les anomenades *molècules efectores* (revisat en Marshal, 1996). Quan Ras interactua amb les GAP, aquestes incrementen en diversos ordres de magnitud l'activitat GTPasa intrínseca de Ras, que és molt lenta, i el converteixen en Ras inactiu, unit a GDP.

En mamífers hi ha cinc GAP específiques de Ras que exerceixen aquesta funció mitjançant un domini catalític amb molta similitud en totes elles (Martin *et al.*, 1990). En la neurofibromina, el producte del gen *NF1*, aquest domini s'anomena domini relacionat amb GAP (*GAP related domain* o GRD) i representa 360 aminoàcids d'aquesta proteï-

na. La proteïna p120GAP fou la primera que va ser aïllada i és el prototipus d'aquesta classe de proteïnes (Trahey i McCormick 1987). La segona va ser la neurofibromina (Xu *et al.*, 1990a). L'homòleg en mamífers del gen de *Drosophila* GAP1, GAP1m, s'ha descrit com la tercera GAP de Ras (Maekawa *et al.*, 1994). Altres membres d'aquesta família de proteïnes són la GAPIII, una isoforma que es troba enriquida en cervell i que té una alta similitud amb GAP1m (Baba *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996) i la GAP1<sup>IP4BP</sup>, que és una proteïna específica d'unió a inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfat (IP4) amb activitat GAP tant cap a Ras com cap a Rap, que pertany a la superfamília de proteïnes Ras (Cullen *et al.*, 1995).

No hi ha diferències significatives en les cinètiques o en els mecanismes d'interacció entre les tres isoformes de Ras (H-,K-,N-) i p120GAP, així com entre aquestes tres i la neurofibromina. En canvi, sí que hi ha diferències en l'afinitat i l'activitat específica de les dues GAP per Ras. L'afinitat del GRD de NF1 per Ras sembla vint vegades més gran que l'afinitat de p120GAP. Però, per altra banda, l'activitat específica de la neurofibromina és trenta vegades menor que la d'aquesta (Martin *et al.*, 1990). Només a concentracions baixes de Ras, la p120GAP i la neurofibromina tindrien activitats comparables (Martin *et al.*, 1990). La manera d'interaccionar entre les dues GAP i Ras és molt similar, la qual cosa suggereix que el mecanisme bàsic d'activació de l'activitat GTPasa és similar en les dues proteïnes (Ahmadian *et al.*, 1997).

### Expressió i estructura de la neurofibromina

La neurofibromina migra com una proteïna de 250 kDa en gels de poliacrilamida-SDS, encara que la mida que es prediu de la seva pauta de lectura oberta és de 327 kDa.

D'altra banda, usant anticossos es detecta un producte d'entre 220-320 kDa. Aquestes discrepàncies s'atribueixen al diferent plegament de la proteïna en els diversos experiments. Es pot dir que la neurofibromina té una expressió ubiqüa i pot ser detectada en tots els teixits, encara que en alguns casos a nivells baixos (Gutmann *et al.*, 1991). Fent *westerns* d'immunoprecipitats de la proteïna s'ha pogut refinar la detecció. L'expressió de la neurofibromina és més alta en cervell i medulla espinal, però també es pot detectar en sistema nerviós perifèric i glàndula adrenal. Es pot detectar en nivells més baixos en fetge, melsa i pàncrees, i amb una expressió molt reduïda en cor (Daston 1992). En el sistema nerviós la neurofibromina es detecta en neurones, oligodendròcits i cèl·lules de Schwann no mielinitzants. Contràriament, astròcits i cèl·lules de Schwann mielinitzants no l'expressen (Daston *et al.*, 1992). No hi ha evidències de glicosilació ni de cap altre processament de la proteïna (Gutmann i Collins, 1993).

La neurofibromina és una proteïna que és fosforilada en residus serina i treonina en resposta a factors de creixement (Gutmann i Collins, 1993). Es poden identificar quatre dominis diferents en la neurofibromina (figura 4): un domini ric en serines i cisteïnes (CSRD), el domini GAP (GRD), un domini amb repeticions de leucines (LRD) i un domini C-terminal (Izawa *et al.*, 1996). En el domini CSRD hi ha tres parelles de cisteïnes, comparables a un domini de la proteïna BCR que serveix d'unió a l'ATP i que és crític per la seva autofosforilació (Maru i Witte, 1991). En el domini LRD hi ha una repetició de leucines interrompudes per una prolina. El domini C-terminal té dos possibles llocs de fosforilació per la MAP quinasa. La neurofibromina també presenta sis possibles llocs de fosforilació per la proteïna quinasa dependent d'AMPc (PKA), tres dels quals recauen dins el domini CSRD (Marchuk *et*

*al.*, 1991; Izawa *et al.*, 1996). De fet, assajos quinasa *in vitro* suggereixen que PKA fosforila principalment el domini CSRD, però també el domini C-terminal, i que aquest últim també és fosforilat per una altra quinasa que no és inhibida per inhibidors específics de la PKA (Izawa *et al.*, 1996). No és clar encara quin paper tenen aquestes fosforilacions en la funció, localització o senyalització de la neurofibromina.

### Localització intracel·lular de la neurofibromina

S'han fet diferents aproximacions per identificar la localització intracel·lular de la neurofibromina. El producte del gen *NF1* s'ha trobat tant a la fracció de membrana com a la citosòlica (Bollag i McCormick, 1991; Hattori *et al.*, 1991; Golubic *et al.*, 1992). La seqüència d'aminoàcids d'aquesta proteïna, però, no revela cap regió d'unió a membrana (Marchuk *et al.*, 1991), la qual cosa evidencia que no és una proteïna integral d'aquesta. Altres experiments en cervell de vaca (Hattori *et al.*, 1992) o en cèl·lules de ratolí NIH3T3 (DeClue *et al.*, 1991) apunten que estaria associada a estructures del citoesquelet. Tincions immunofluorescents en fibroblasts de cangur revelen que la neurofibromina s'associa a microtúbuls (Gutmann i Collins 1992; Gregory *et al.*, 1993), però això no passa en cèl·lules NIH3T3 (Golubic *et al.*, 1992). Seccions de cervell de rata observades pel microscopi electrònic localitzen la neurofibromina en el reticle endoplasmàtic llis de neurones (Nordlund *et al.*, 1993). Recentment, estudis tant immunocitoquímics com bioquímics han trobat que la neurofibromina colocalitza amb el mitocondri, i no amb l'actina,  $\beta$ -tubulina o reticle endoplasmàtic (RE) (Rodebush *et al.*, 1997). Fent transferències *western* amb fraccions mitocondrials molt pures de cor boví, es

confirma la presència d'aquesta proteïna, però no es descarta que part de la neurofibromina pugui estar associada a RE o fins i tot pugui ser a la coberta perinuclear. El fet d'utilitzar tipus cel·lulars diferents, diverses espècies animals i tècniques distintes en cada experiment esmentat fa difícil poder donar una interpretació definitiva clara.

### Funció de la neurofibromina

Una vegada clonat el gen *NF1*, se'n va poder estudiar la zona codificant. L'anàlisi de la seqüència va revelar una zona de similitud amb la superfamília de proteïnes activadores de GTPases, com ja s'ha esmentat (Xu *et al.*, 1990a; Buchberg *et al.*, 1990). Aquesta família inclou tant les GAP de mamífers com les de llevat IRA1 i IRA2, les de llevat de fisió sar1 o la proteïna GAP1 de *Drosophila*. L'homologia es va veure que residia sobretot en el domini catalític, encara que entre la neurofibromina i IRA1, IRA2 i sar1 la similitud s'estenia a un fragment més gran de la proteïna (Xu *et al.*, 1990a). Es va comprovar que el domini GRD de la neurofibromina interactuava amb Ras de llevat i de mamífers, i el regulava negativament en el seu estat normal (Ballester *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990; Xu *et al.*, 1990b). De fet, tan sols noranta-un aminoàcids d'aquest domini ja eren capaços de revertir el fenotip maligne induït per l'oncogen víric v-H-Ras (Nur-e-Kamal *et al.*, 1993). Es van fer estudis de mutagènesi dirigida i es va observar que mutacions en el GRD reduïen l'activitat GAP (Li *et al.*, 1992; Gutman *et al.*, 1993; Poulet *et al.*, 1994). Recentment, s'ha identificat una seqüència *consensus* d'unió a Ras-GTP en un subgrup de possibles efectors de Ras, entre ells Raf i la neurofibromina (Clark *et al.*, 1996). L'expressió cel·lular de pèptids sintètics que contenen aquesta seqüència és capaç d'inhibir l'estimulació de l'activitat GTPasa de Ras

que exerceix la neurofibromina. També són capaços de bloquejar l'activitat mitogènica deguda a l'estimulació de Ras per proteïnes quinasa. Així, aquests pèptids sintètics bloquejarien la unió dels efectors a Ras.

La neurofibromina podria regular el creixement induït per Ras mitjançant altres vies, a més de la seva activitat GAP. S'han fet experiments encaminats a dissociar aquesta activitat de la inhibició del creixement. En aquest sentit Johnson i col·laboradors (1994), sobreexpressant la neurofibromina en cèl·lules NIH3T3, n'inhibien el creixement sense alterar la quantitat de Ras unit a GTP. Aquesta sobreexpressió també podia revertir el creixement de cèl·lules transformades per una proteïna Ras resistent a l'activitat GAP.

Un altre conjunt d'experiments ha demostrat que la funció GAP de la neurofibromina pot ser inhibida per diferents lípids, entre ells: l'àcid araquidònic, l'esteàric i el fofatidilinositol-4,5-bisfosfat o el detergent dodecil  $\beta$ -D-maltòsid (Golubic *et al.*, 1991; Han *et al.*, 1991; Bollag i McCormik 1991; revisat en Shen *et al.*, 1996).

S'ha trobat que l'activitat GAP de la neurofibromina també pot ser inhibida per la tubulina (Bollag *et al.*, 1993). De fet, la neurofibromina s'ha trobat colocalitzada amb els microtúbuls (Gregory *et al.*, 1993). Existeix un segment de vuitanta residus immediatament N-terminal al domini GAP que serveixen d'unió a la tubulina, principal component dels microtúbuls. Recentment, estudis de mutagènesi dirigida cap a residus molt conservats del GRD demostren que algunes mutacions trenquen la capacitat d'associació de la neurofibromina als microtúbuls (Xu i Gutmann, 1997). El significat biològic d'aquesta associació encara no està determinat. Es postula que la unió a microtúbuls podria mantenir la neurofibromina lluny de Ras, o també podria ser que la neurofibromina mitajncés senyals entre Ras i la tubuli-

na per reorganitzar el citoesquelet (revisat en Shen *et al.*, 1996).

Tot i que l'única funció reconeguda de la neurofibromina és la GAP, el domini GRD només representa un 13 % de la proteïna. Per tant, és molt probable que altres dominis tinguin diferents funcions, fins ara desconegudes. L'estudi d'aquests permetrà comprendre el conjunt de funcions biològiques que exerceix la neurofibromina en els diferents tipus cel·lulars.

### La neurofibromina en la via de transducció de senyal de l'AMPc

Experiments fets en diverses espècies s'han concentrat en estudiar el possible paper de la neurofibromina en el senyal de transducció mitjançat per la concentració del segon missatger AMPc. En *S. cerevisiae*, Ras controla l'activitat de l'adenilat ciclase, enzim que produeix l'AMPc. *IRA-1* i *IRA-2*, que són els homòlegs a *NF1* en aquest llevat, controlen negativament la via de Ras-AMPc.

Per altra banda, estudis que utilitzen mutants en homozigosi pel gen *NF1* en *Drosophila* mostren que en aquests *knockouts* no hi ha signes evidents d'alteració del senyal mitjançat Ras1 (homòleg de Ras en aquest organisme) (The *et al.*, 1997). La pèrdua de *NF1* fa que tant les larves com les pupes o els adults tinguin una reducció de mida. Inhibint el senyal promogut per Ras1, el fenotip no reverteix i en canvi sí que ho fa quan s'expressa la proteïna quinasa dependent d'AMPc (PKA) activada. Aquests experiments suggereixen que *NF1* i PKA interactuen en una via de transducció que controla el creixement global en *Drosophila*. En aquests mutants s'aboleix l'increment de corrents de potasi que es dona en les unions neuromusculars. En concret, els mitjançats pel neuropèptid PACAP38 (polipèptid activador de l'adenilat ciclase pituitària). Guo i

col·l. (1997) demostren que la neurofibromina és essencial en la resposta que exerceix PACAP38. Exposant les preparacions de cèl·lules neuromusculars d'aquests mutants a tractaments farmacològics que incrementen les concentracions d'AMPc, es restableixen els corrents de potasi. D'aquesta manera els autors demostren que la neurofibromina és un component crucial per a l'activació de la via de l'AMPc.

L'AMPc té un paper decisiu en el desenvolupament de les cèl·lules de Schwann, (proliferació i diferenciació). En cèl·lules de Schwann de ratolí deficientes en neurofibromina, l'elevació de l'AMPc provoca un augment en la proliferació de quaranta vegades més que si no són tractades. Això no passa en cèl·lules de Schwann normals o amb una còpia del gen *NF1* (Kim *et al.*, 1997). Aquests resultats fan pensar que l'activació de la via de l'AMP pot induir a la hiperplàsia en cèl·lules de Schwann que no tenen neurofibromina.

Finalment, cal esmentar que la zona promotora del gen *NF1* d'humans i de ratolins està altament conservada (Hajra *et al.*, 1994, vegeu l'apartat d'estructura del gen) particularment en la regió compresa entre els nucleòtids -33 i +261, on hi ha perfectament conservat un motiu d'unió a CREB (proteïna d'unió a l'element de resposta a AMPc). Aquest és un factor de transcripció que és substrat per a PKA i que regula l'expressió de diversos gens en resposta als efectes de l'AMPc.

## ASPECTES PATOLÒGICS DE LA NF1: DISPLÀSIA I NEOPLÀSIA

Com s'ha esmentat al principi, la NF1 és una malaltia que afecta diferents tipus de teixits com la pell, el sistema nerviós central i perifèric, l'iris i el sistema esquelètic. Preferentment afecta els tipus cel·lulars derivats de les crestes neurals. Els pacients amb NF1 tenen, a més, una predisposició a patir certs

tipus de tumors tant benignes com malignes. Per tant, hi ha dos tipus de manifestacions: aquelles que representen vertaderes neoplàsies o aquelles que són displàsies, o sigui malformacions en el desenvolupament.

### Manifestacions displàstiques

En general, hi ha molt pocs estudis encaminats a aprofundir en la patologia molecular d'aquestes manifestacions, tot i que es creu que poden ser degudes a la manca parcial o total de la neurofibromina en els teixits afectats en un moment del desenvolupament (especialment en aquells tipus cel·lulars que són derivats de les crestes neurals), sense descartar el possible efecte d'altres gens modificadors. Podem trobar les següents manifestacions displàstiques associades a la NF1: taques cafè amb llet, lesions esquelètiques, nòduls de Lisch i altres lesions malformatives, com per exemple de la regió cortical del cervell.

Les taques cafè amb llet són lesions pigmentades de la pell. Constitueixen una displàsia dels melanòcits que no comporta un risc de neoplàsia. Recentment s'han fet estudis genètics en cultius de melanòcits d'aquestes regions de la pell. No s'han trobat deleccions en el gen de la NF1 mitjançant l'estudi de pèrdues d'heterozigositat amb marcadors polimòrfics intragènics (Eisebarth *et al.*, 1997). En el mateix treball es suggereix que l'origen d'aquestes taques és monoclonal. La displàsia de l'esfenoide o la displàsia cortical d'ossos llargs són les lesions esquelètiques més comunes en pacients amb NF1: poden arribar a ser del 7 % (Rubenstein, 1984). Aquestes manifestacions poden ser la causa de futures fractures o pseudoartrosi. Els nòduls de Lisch, o hamartomes de l'iris, representen nòduls ben circumscrits que es desenvolupen a qualsevol lloc de la superfície de l'iris. Hi ha una gran variació en la mida i el grau de

TAULA 4. Tumors que tenen alteracions al gen *NF1*.

| Tipus de tumor            | Associat amb <i>NF1</i> | Tipus alteració                              | Referència   |
|---------------------------|-------------------------|--|--|
| Astrocitoma               | Sí                      | Canvi aa (Lys1423Glu)                        | Li <i>et al.</i> 1992  |
| Feocromocitoma            | Sí                      | Delecions                                    | Xu <i>et al.</i> 1992  |
| Leucèmia mieloide         | Sí                      | Delecions                                    | Shannon <i>et al.</i> 1994;<br>Side <i>et al.</i> 1997                               |
| Neuroblastoma             | Sí                      | Delecions, inactivació <i>NF1</i> homozigosi | The <i>et al.</i> 1993<br>Johnson <i>et al.</i> 1993                                 |
| Neurofibromes             | Sí                      | Delecions, inactivació <i>NF1</i> homozigosi | Colman <i>et al.</i> 1995;<br>Sawada <i>et al.</i> 1996;<br>Serra <i>et al.</i> 1997 |
| Adenocarcinoma de còlon   | No                      | Canvi aa (Lys1423Glu)                        | Li <i>et al.</i> 1992  |
| Síndrome mielodisplàstica | No                      | Canvi aa (Lys1423Glu)                        | Li <i>et al.</i> 1992  |
| Melanoma maligne          | No                      | Canvi aa (Lys1423Glu)                        | Andersen <i>et al.</i> 1993;<br>Johnson <i>et al.</i> 1993                           |

pigmentació. En conjunt són considerats hamartomes melanocítics sense evidència de malignització cap a melanoma maligne. *Altres lesions malformatives* poden afectar l'arquitectura del còrtex, l'orientació a l'atzar de les neurones o el desarranjament de la laminació cortical, entre d'altres. Aquestes manifestacions podrien ser les causants de les deficiències en els processos intel·lectuals o el retard mental, que de vegades s'associen a aquesta malaltia hereditària.

## Neoplàsia

Com ja s'ha descrit anteriorment, la neurofibromina és una proteïna amb funció

GAP que actua inactivant Ras (vegeu apartat de funció de la neurofibromina). Molts experiments s'han encaminat a demostrar que en tumors relacionats amb la NF, Ras està anormalment regulat (Basu *et al.*, 1992; DeClue *et al.*, 1992; Bollag *et al.*, 1996; Largaespada *et al.*, 1996a; Guha *et al.*, 1996; Gutmann *et al.*, 1996). D'altres han demostrat que el gen *NF1* es troba alterat en diferents tipus tumorals, estiguin o no relacionats amb la malaltia (taula 4). Tot aquest conjunt d'estudis ha evidenciat que el gen *NF1* és un gen supressor de tumors. La teoria de Knudson del «doble impacte» (Knudson, 1971) postula que es necessiten les dues còpies alterades d'un mateix gen supressor de tumors perquè aquest contribueixi a un fenò-

tip tumoral. En les malalties hereditàries com la NF1, una de les mutacions és germinal i per tant és en totes les cèl·lules de l'individu. La segona mutació (en l'al·lel normal) és somàtica i pot ser una mutació puntual, o qualsevol esdeveniment que impedeixi la funció normal d'aquell al·lel. En l'àmbit molecular, les delecions són més fàcils de detectar. S'utilitzen marcadors genètics polimòrfics, que s'interpreten com a pèrdues d'heterozigotitat (LOH). Així, s'han trobat mutacions en les dues còpies del gen *NF1* tant en tumors no relacionats amb la malaltia, com melanoma o el neuroblastoma (Andersen, 1993a; The *et al.*, 1993), com en tumors malignes associats a la malaltia, com el neurofibrosarcoma (Legius, 1993), o benignes, com els neurofibromes (Colman *et al.*, 1995; Sawada *et al.*, 1996; Serra *et al.*, 1997).

Dins els tumors relacionats amb la NF1, per la seva incidència o gravetat, cal destacar-ne uns quants tipus: els neurofibromes, els neurofibrosarcomes, les leucèmies mieloides i els gliomes òptics.

Els *neurofibromes* són tumors benignes que s'originen a partir de la beina dels nervis perifèrics. Estan constituïts per diferents tipus cel·lulars, encara que les cèl·lules de Schwann i els fibroblasts són majoritaris. Normalment se situen a la dermis, no malignitzen, apareixen a partir de l'etapa prepuberal i un mateix pacient en pot arribar a tenir molts. Quan els neurofibromes afecten nervis importants s'anomenen neurofibromes plexiformes. Aquests normalment són congènits, poden afectar grans porcions del cos i en un 5 % poden malignitzar cap a neurofibrosarcomes (Huson i Hughes, 1994). S'han fet diferents estudis genètics amb els neurofibromes. Skuse i col·laboradors (1991) van demostrar que aquests tumors tenien un origen monoclonal. També s'ha estudiat l'estat del gen *NF1* en aquests tumors i, encara que els primers estudis no van trobar cap alteració, recentment s'ha

descriu LOH en els neurofibromes i s'ha vist que, almenys en un 25 %, les dues còpies del gen *NF1* estan inactives (Colman *et al.*, 1995; Sawada *et al.*, 1996; Serra *et al.*, 1997). Encara no està del tot clar quin és el tipus cel·lular que origina aquests tumors.

Menys del 5 % dels pacients amb NF1 desenvolupen *neurofibrosarcomes* (Huson i Hughes, 1994). Aquests tumors tenen un creixement agressiu i metastàtic, com la resta de sarcomes. Diferents estudis han revelat LOH o inactivació de les dues còpies del gen *NF1* (Skuse *et al.*, 1989; Legius *et al.*, 1993). També s'han detectat altres alteracions genètiques, com delecions a 17p o mutacions a p53 (Menon *et al.*, 1990).

Els pacients amb NF1 tenen una predisposició a patir diferents tipus de *leucèmies mieloides juvenils*, especialment la leucèmia mieloides crònica juvenil (JCML), i un trastorn relacionat, anomenat síndrome de la monosomia 7 (resumit en Largaespada *et al.*, 1996b). El risc de patir JCML en un pacient amb NF1 és d'entre dues-centes i cinc-centes vegades més elevat que en una persona normal (Side *et al.*, 1997). Cèl·lules leucèmiques de pacients amb NF1 i JCML tenen les dues còpies del gen *NF1* inactivades (Shannon *et al.*, 1994; Side *et al.*, 1997) cosa que confirma que aquest gen funciona com un supressor de tumors en cèl·lules mieloides immadures. Experiments recents han demostrat que la pèrdua del gen *NF1* pot ser suficient per produir els símptomes mieloproliferatius associats a la JCML (Bollag *et al.*, 1996; Largaespada *et al.*, 1996a). Sembla que la neurofibromina és essencial per regular el senyal de Ras en resposta al factor estimulant de colònies macròfag/granulòcit (GM-CSF).

Els *gliomes òptics* constitueixen un dels tipus tumorals més freqüents en la NF1. Representen d'un 2 % a un 5 % dels tumors de cervell en infants, el 70 % dels quals estan associats a NF1 (Listernick *et al.*, 1997). S'ha demostrat immunocitoquímicament que te-

nen un origen astrocític. Tot i que normalment es comporten de manera benigna, poden portar a la pèrdua de vista o estendre's a regions properes del cervell. Un estudi recent troba associació entre tenir un glioma òptic i la presència d'un altre tumor del sistema nerviós central en pacients amb NF1 (Friedman i Birch, 1997).

## MODELS ANIMALS

Existeixen diferents tipus de models animals per a la NF1. Hi ha animals que tenen la malaltia de manera natural, altres on la neurofibromatosi és induïda per agents químics i també hi ha models animals creats mitjançant la manipulació genètica. Tot i que no és totalment comparable a la malaltia en humans, la NF1 es dona espontàniament en moltes espècies (Muntaner, 1996). D'especial interès són els estudis que s'han fet en el peix *Pomacentrus partitus*, anomenat també *bicolor damselfish*. Aquest peix, que es troba a les aigües de Florida, pot presentar, a vegades, neurofibromes disseminats, neurofibromes plexiformes, schwanomes malignes i lesions epidèrmiques hiperpigmentades (Schmale *et al.*, 1986). S'ha vist que aquesta neurofibromatosi és transmissible per inoculacions d'homogenats de tumor de peixos afectes a peixos sans. Aquest fet ha portat a identificar en cèl·lules dels neurofibromes de peixos afectes, partícules retrovíriques que encara no estan totalment caracteritzades (Schmale *et al.*, 1996). Per altra banda, estudis de lligament fets en vedelles Holstein amb neurofibromatosi cutània van demostrar que dues vedelles amb aquesta malaltia havien heretat el mateix al·lel *NF1* patern (Sartin *et al.*, 1994).

Mitjançant l'administració transplacentària de l'agent químic N-nitroso-N-etilurea (ENU) es pot induir un fenotip que s'assembla a la neurofibromatosi humana, tant en

hàmsters com en rates (Perantoni *et al.*, 1987; Cardesa *et al.*, 1989; Nakamura *et al.*, 1989). S'ha vist que els tumors del sistema nerviós perifèric de rates induïts amb aquest agent contenen mutacions en l'oncogen *neu* (Perantoni *et al.*, 1987). També s'han trobat mutacions específiques en *neu* en neurofibromes induïts per l'ENU en hámster, però no en *erbB-2* (homòleg en humans) en neurofibromes humans (Nakamura *et al.*, 1994a). L'expressió de la neurofibromina és molt alta en cèl·lules de Schwann de nervis perifèrics de hámster i es veu reduïda en els neurofibromes induïts per l'ENU (Nakamura *et al.*, 1994b).

Ratolins transgènics que expressen el gen *tax* del virus T-limfotrófic de tipus 1 humà (HTLV-1), sota el control d'elements reguladors virals, desenvolupen neurofibromes múltiples (Hinrichs *et al.*, 1987). La proteïna codificada per *tax* es pot unir a un activador *transcripcional* que tant es troba en l'LTR del virus HTLV-1 com en el promotor d'altres gens cel·lulars (revisat en Yoshida *et al.*, 1995). S'ha vist que aquesta proteïna pot reprimir l'expressió del gen *NF1* unint-se a una seqüència localitzada immediatament abans de l'inici de transcripció, i així permet el desenvolupament de neurofibromes sense que hi hagi mutacions directes sobre el gen (Feigenbaum *et al.*, 1996).

També s'han generat ratolins heterozigots o homozigots per mutacions que inactiven el gen *NF1* (Brannan *et al.*, 1994; Jacks *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1997). Els ratolins heterozigots no mostren cap dels símptomes

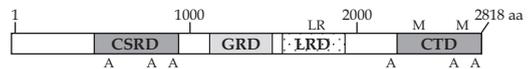


FIGURA 4. Representació esquemàtica dels diferents dominis de la Neurofibromina segons la seva seqüència. **CSRD**: domini ric en cisteïnes; **GRD**: *GAP related domain*; **LRD**: domini ric en leucines; **CTD**: domini C-terminal. **A**: residus susceptibles de ser fosforilats per la PKA. **M**: residus susceptibles de ser fosforilats per la MAP quinasa. Extret d'Izawa *et al.*, 1996.

clàssics de la NF1 en humans, però tenen una alta predisposició a desenvolupar tumors, especialment feocromocitomes (tumors de la medul·la adrenal) i leucèmies mieloides. Els ratolins *knockout* pel gen *NF1* moren en l'úter entre els dies 12 i 14,5 de gestació i presenten defectes en el desenvolupament del cor i en alguns teixits derivats de les crestes neurals. També s'han fet *knockouts* pel gen *p120GAP*, que moren en l'úter cap al dia 10,5 (Henkemeyer *et al.*, 1995). En aquests mutants les cèl·lules endotelials no es poden organitzar per formar una xarxa altament vascularitzada, la qual cosa provoca una gran mort neuronal. S'han aprofitat aquests ratolins per fer dobles *knockouts* pel gen *p120GAP* i per *NF1*, amb els quals s'ha vist un efecte sinèrgic entre els dos gens. Aquests embrions mostren un fenotip *GAP(-/-)* encara més exacerbada, cosa que confirma que *p120GAP* i la neurofibromina actuen conjuntament per regular l'activitat de Ras durant el desenvolupament embrionari. Finalment, cal esmentar que s'ha desenvolupat un ratolí *NF1 (+/-)* com a model per a les mancances de memòria i aprenentatge associades a la NF1 (Silva *et al.*, 1997). Com en els humans, les mancances en l'aprenentatge i en la memòria en aquests ratolins estan restringides a tipus específics d'aprenentatge, no són totalment penetrants, es poden compensar incrementant un treball específic d'aquestes àrees i no inclouen mancances en l'aprenentatge d'associacions simples.

### CONSELL GENÈTIC I NEUROFIBROMATOSI 1

El consell genètic per a la NF1 es pot oferir a diferents àmbits: confirmació diagnòstica, diagnòstic presimptomàtic i diagnòstic prenatal de la malaltia. *A priori*, el risc de recurrència en la descendència per a un pacient amb NF1 és del 50 % (malaltia au-

tosòmica dominant). En canvi, el risc de recurrència en la futura descendència per als pares asimptomàtics d'un cas esporàdic de NF1 es considera gairebé negligible. Això és perquè s'assumeix que la penetració en la NF1 és del 100 % a una edat superior als cinc anys i perquè sembla que el nombre de casos de mosaïcismes germinals per NF1 és molt escàs (Riccardi i Lewis, 1988; Lázaro *et al.*, 1994a) (figura 1) (vegeu l'apartat de mosaïcisme i neurofibromatosis). Si ens trobem davant un progenitor d'un cas esporàdic que presenta característiques limitades de NF1, normalment amb una distribució segmental, probablement es tracta d'un cas de mosaïcisme (somàtic o gonosòmic). Actualment és impossible donar un risc de recurrència acurat en aquests casos i normalment es dona un risc de recurrència empíric del 5 % (Huson i Hughes, 1994).

Fins a l'aparició de les tècniques de genètica molecular, no existia cap mètode per poder realitzar diagnòstics prenatals o presimptomàtics de la malaltia. El diagnòstic molecular més acurat per a una malaltia monogènica es pot donar quan el gen responsable d'aquesta malaltia està clonat i s'en coneix la patologia molecular. En el cas

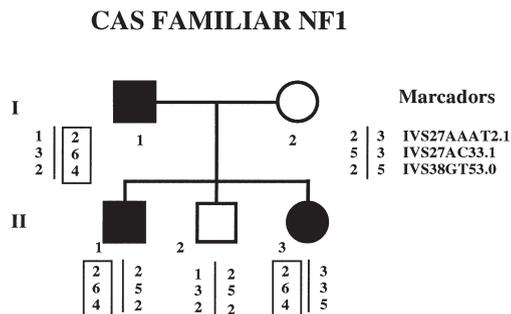


FIGURA 5. Exemple de l'estudi de segregació de marcadors de la regió NF1 per un cas familiar de neurofibromatosis tipus 1. L'haplòtip que segrega amb la malaltia està enquadrat i és el que comparteixen els tres afectats de la família, (pare, fill gran i filla). Així és com es pot realitzar la confirmació diagnòstica de la malaltia, o realitzar un diagnòstic presimptomàtic per la NF1 en els casos familiars.

concret de la NF1, l'enfocament en aquest aspecte ha anat variant segons s'ha avançat en el coneixement del gen *NF1* i de la seva patologia molecular. Així doncs, abans del clonatge de *NF1* només es podia oferir consell genètic als casos familiars de neurofibromatosi, on es feia una anàlisi de lligament genètic per tal d'identificar l'haplotip de risc associat a la malaltia (figura 5). Primerament es van utilitzar marcadors del tipus RFLP que mostraven lligament genètic amb el locus *NF1* (Fain *et al.*, 1989). Un cop clonat el gen es van desenvolupar nous marcadors intragènics, sobretot dels del tipus microsatèl·lit (Xu *et al.*, 1991; Andersen *et al.*, 1993; Lázaro *et al.*, 1993 i 1994b; Weiss, comunicació personal), amb els quals el nombre de famílies informatives s'ha incrementat molt. L'únic problema d'aquesta anàlisi indirecta de la malaltia és que només se'n poden beneficiar les famílies amb més d'un individu afectat, és a dir, els casos familiars. També es poden beneficiar d'aquestes anàlisis les persones que són casos esporàdics de NF1 i que han tingut un fill sense NF1 (Lázaro *et al.*, 1992).

Després de la caracterització del gen *NF1* es va obrir la possibilitat al diagnòstic directe de la malaltia mitjançant la recerca de la mutació responsable. Malauradament existeixen força problemes que fan difícil aquesta anàlisi, com són la no existència de cap mutació majoritària i l'elevat nombre d'exons que componen el gen *NF1*. De fet, tot i que aquest es va identificar el 1990, hi ha pocs laboratoris que realitzin una cerca exhaustiva de mutacions com a eina diagnòstica. Tanmateix, en els dos darrers anys hi ha hagut un gran avenç en la cerca de mutacions emprant diferents tècniques d'anàlisi a partir de RNA. S'han utilitzat les tècniques del test de la proteïna truncada (Heim *et al.*, 1994 i 1995) i l'anàlisi de SSCPs/heterodúplex de cDNA (Gasparini *et al.*, 1996; Ars *et al.* 1998). Ambdues tècniques són força eficients i detecten un 60-70 % de les mutacions *NF1*.

cients i detecten un 60-70 % de les mutacions *NF1*.

Tot i que fa força anys que existeixen marcadors indirectes per realitzar el diagnòstic prenatal, la demanda d'aquests diagnòstics no ha estat gaire àmplia. Ward *et al.* (1990) i Hofman i Boehm (1992) han descrit la seva experiència als Estats Units; Upadhyaya *et al.* (1992), la seva experiència al Regne Unit; Rodenhiser *et al.* (1993), la seva a Ontàrio; Elyakim *et al.* (1994), a Israel, i el nostre grup (Lázaro *et al.*, 1995), a Espanya. En total es descriuen molt pocs casos de diagnòstics prenatals si es considera la incidència tan elevada de la malaltia. Moltes de les parelles que sol·liciten consell genètic tindrien en consideració un diagnòstic prenatal si es predigués la severitat de la malaltia, cosa del tot impossible en aquests moments. Normalment, quan a la família s'han donat formes molt greus de la malaltia és quan la decisió del diagnòstic prenatal és més clara. També existeixen casos en què els pares volen saber l'estat del futur fill sense cap intenció d'interrompre l'embaràs. Les noves tècniques de detecció de mutacions *NF1* fan possible el diagnòstic prenatal directe, cosa que és de gran importància per als casos esporàdics de la malaltia (Ars *et al.*, manuscrit en preparació).

## TERÀPIA PER A LA NF1

En aquests moments encara no hi ha un tractament mèdic per pal·liar o revertir cap de les manifestacions clíniques de la NF1. Per aquest motiu és de gran importància un bon seguiment clínic dels pacients, per tal de tractar millor les possibles complicacions associades amb la malaltia, com també per oferir un bon consell genètic a les famílies NF1. Existeixen alguns grups que estan començant a provar agents farmacèutics, sobretot contra l'acció relacionada amb Ras o

la funció GAP de la neurofibromina, dirigits a les neoplàsies benignes o malignes. Bloquejar la farnesilació de Ras perquè no es pugui unir a la membrana i inactivar-ne així l'acció és una de les aproximacions que s'han provat (Chen *et al.*, 1991; Kinsella *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1997). Inhibidors de la farnesilació de Ras disminueixen tant la formació de clons com la hiperproliferació de les cèl·lules de ratolí que no tenen neurofibromina (Kim *et al.*, 1997).

Aproximacions de teràpia gènica per a la NF1 semblen molt llunyanes per diverses raons, com ara la gran mida del gen, l'afectació de diversos teixits i la manca de bons models animals per a la malaltia, entre d'altres. Actualment, la manifestació clínica que té més possibilitats de gaudir de beneficis terapèutics basats en la transferència gènica són els tumors. S'ha descrit que una sobreexpressió del domini GRD de la neurofibromina redueix molt la capacitat proliferativa de cèl·lules transformades (Nur-E-Kamal *et al.*, 1993).

El progrés realitzat en el coneixement de la neurofibromatosis tipus 1 en els vuit anys des de la identificació del gen *NF1* ha estat notable. Aquests avenços permeten oferir a les famílies amb NF1 una confirmació diagnòstica o un diagnòstic presimptomàtic/prenatal de la malaltia. És d'esperar que en els propers anys l'allau de recerca que s'està produint en aquesta malaltia pugui aportar beneficis terapèutics per als pacients amb NF1.

## AGRAÏMENTS

El nostre agraïment als clínics i a les famílies de NF1 que han participat en el nostre estudi. Aquest treball ha estat finançat per l'Institut Català de la Salut, per ajuts del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS92/532, 95/368 i 98/992), per la Fundació Au-

gust Pi i Sunyer/Marató de TV3 i per la Direcció General de Recerca (1997SGR00085). E. A. és becària de la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica de la Generalitat de Catalunya.

## BIBLIOGRAFIA

- AHMADIAN, M. R.; U. HOFFMANN; R. S. GOODY; A. WITTINGHOFFER (1997). «Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTP-ase activating proteins determined by fluorescence spectroscopy». *Biochem.*, núm. 36, pàg. 4535-4541.
- AINSWORTH, P. J.; D. I. RODENHISER; M. T. COSTA (1993). «Identification and characterisation of sporadic and inherited mutations in exon 31 of the neurofibromatosis (*NF1*) gene». *Hum. Genet.*, núm. 91, pàg. 151-156.
- ANDERSEN, L. B.; J. W. FOUNTAIN; D. H. GUTMANN; S. A. TARLÉ; T. W. GLOVER; N. C. DRACOPOLI; D. HOUSMAN; F. S. COLLINS (1993a). «Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines». *Nature Genet.*, núm. 3, pàg. 118-121.
- ANDERSEN, L. B.; S. A. TARLÉ; D. A. MARCHUK; E. LEGIUS; F. S. COLLINS (1993b). «A highly informative compound nucleotide repeat in the neurofibromatosis (*NF1*) gene». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 2, pàg. 1083.
- ARS, E.; H. KRUYER; A. GAONA; P. CASQUERO; J. ROSELL; V. VOLPINI; E. SERRA; C. LÁZARO; X. ESTIVILL (1998). «A clinical variant of neurofibromatosis type 1: familial spinal neurofibromatosis with a frameshift mutation in the *NF1* gene». *Am. J. Hum. Genet.* (en premsa).
- BABA, H.; B. FUSS; J. URANO; P. POULLET; J. B. WATSON; F. TAMANOI; W. B. MACKLIN (1995). «GapIII, a new brain-enriched member of the GTPase-activating protein family» *J. Neurosci. Res.*, núm. 41, pàg. 846-858.
- BALLESTER, R.; D. MARCHUK; M. BOGUSKI; A. SAULINO; R. LETCHER; M. WIGLER; F. S. COLLINS (1990). «The *NF1* locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast *IRA* proteins». *Cell*, núm. 63, pàg. 851-859.
- BARKER, D.; E. WRIGHT; K. NGUYEN; L. CANNON; P. FAIN; D. GOLDFAR; D. T. BISHOP; J. CAREY; J. KIVLIN; H. WILLARD; Y. NAKAMURA; P. O'CONNELL; M. LEPPERT; R. L. WHITE; M. SKOLNICK (1987). «A genomic search for linkage of neurofibromatosis to RFLPs». *J. Med. Genet.*, núm. 24, pàg. 536-538.
- BASU, T. N.; D. H. GUTMANN; J. A. FLETCHER; T. W. GLOVER; F. S. COLLINS; J. DOWNWARD (1992). «Aberrant

- regulation of ras proteins in tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients». *Nature*, núm. 356, pàg. 713-715.
- BERNARDS, A.; A. J. SNIJDERS; G. E. HANNIGAN; A. E. MURTHY; J. F. GUSELLA (1993). «Mouse neurofibromatosis type 1 cDNA sequence reveals high degree of conservations of both coding and non-coding mRNA segments». *Hum. Mol. Gen.*, núm. 2, pàg. 645-650.
- BERNARDS, A.; J. F. GUSELLA (1994). «The importance of genetic mosaicism in human disease». *N. Engl. J. Med.*, núm. 331, pàg. 1447-1449.
- BÖDDRICH, A.; P. N. ROBINSON; N. SCHÜLKE; A. BUSKE; S. TINSCHERT; P. NÜRNBERG (1997). «New evidence for a mutation hotspot in exon 37 of the NF1 gene». *Hum. Mut.*, núm. 9, pàg. 374-377.
- BOGUSKI, M. S.; F. MC CORMICK (1993). «Proteins regulating Ras and its relatives». *Nature*, núm. 366, pàg. 643-654.
- BOLLAG, G.; D. W. CLAPP; S. SHIH; F. ALDER; Y. Y. ZHANG; P. THOMPSON; B. J. LANGE; M. H. FREEDMAN; F. MCCORMICK; T. JACKS; K. SHANNON (1996). «Loss of the NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells». *Nature Genet.*, núm. 12, pàg. 1444-1448.
- BOLLAG, G.; F. MCCORMICK; R. CLARCK (1993). «Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity». *EMBO J.*, núm. 12, pàg. 1923-1927.
- BOLLAG, G.; F. MCCORMICK (1991). «Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities». *Nature*, núm. 351, pàg. 576-579.
- BRANNAN, C. I.; A. S. PERKINS; K. S. VOGEL; N. RATNER; M. L. NORDLUND; S. W. REID; A. M. BUCHBERG; N. A. JENKINS; L. F. PARADA; N. G. COPELAND (1994). «Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various enural crest-derived tissues». *Genes Develop.*, núm. 8, pàg. 1019-1029.
- BUCHBERG, A. M.; L. S. CLEVELAND; N. A. JENKINS; N. G. COPELAND (1990). «Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and *IRA-1* and *IRA-2* negative regulators of the Ras cyclic AMP pathway». *Nature*, núm. 347, pàg. 291-294.
- CAPPIONE, A. J.; B. L. FRENCH; G. R. SKUSE (1997). «A potential role for NF1 mRNA editing in the pathogenesis of NF1 tumors». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 60, pàg. 305-312.
- CARDESA, A.; T. RIBALTA; B. VON SCHILLING; A. PALACÍN; U. MOHR (1989). «Experimental model of tumors associated with neurofibromatosis». *Cancer*, núm. 63, pàg. 1737-1749.
- CAWTHON, R. M.; R. WEISS; G. XU; D. VISKOCHIL; M. CULVER; J. STEVENS; M. ROBERTSON; D. DUNN; R. GESTELAND; P. O'CONNELL; R. WHITE (1990). «A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations». *Cell*, núm. 62, pàg. 193-201.
- CHEN, W. J.; D. A. ANDRES; J. L. GOLDSTEIN; M. S. BROWN (1991). «Cloning and expression of a cDNA encoding the  $\alpha$ -subunit of rat p21ras protein farnesyltransferase». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, núm. 88, pàg. 11368-11372.
- CLARK, G. J.; J. K. DRUGAN; R. S. TERRELL; C. BRADHAM; C. J. DER; R. M. BELL; S. CAMPBELL (1996). «Peptides containing a consensus Ras binding sequence from Raf-1 and the GTPase activating protein NF1 inhibit Ras function». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, núm. 93, pàg. 1577-1581.
- CLARK, R. D.; J. J. HUTTER (1982). «Familial neurofibromatosis and juvenile chronic myelogenous leukemia». *Hum. Genet.*, núm. 60, pàg. 230-232.
- COLMAN, S. D.; C. A. WILLIAMS; M. R. WALLACE (1995). «Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of NF1 gene». *Nature Genet.*, núm. 11, pàg. 90-92.
- COOPER, D. N.; H. YOUSOUFIAN (1988). «The CpG dinucleotide and human genetic disease». *Hum. Genet.*, núm. 78, pàg. 151-155.
- CROWE, F. W.; W. J. SCHULL; J. V. NEEL (1956). *A Clinical, Pathological and Genetic Study of Multiple Neurofibromatosis*. Springfield: Charles C. Thomas.
- CULLEN, P. J.; J. J. HSUAN; O. TRUONG; A. J. LETCHER; T. R. JACKSON; A. P. DAWSON; R. F. IRVINE (1995). «Identification of a specific Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>-binding protein as a member of the GAP1 family». *Nature*, núm. 376, pàg. 527-530.
- CUMMINGS, L. M.; J. M. TRENT; D. A. MARCHUK (1996). «Identification and mapping of type 1 neurofibromatosis (NF1) homologous loci». *Cytogenetics and Cell Genetics*, núm. 73, pàg. 334-340.
- DANGLLOT, G.; V. REGNIER; D. FAUVET; G. VASSAL; M. KUJAS; A. BERNHEIM (1995). «Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene». *Hum. Mol. Gen.*, núm. 4, pàg. 915-920.
- DASTON, M. M.; H. SCRABLE; M. NORDLUND; A. K. STURBAUM; L. M. NISSEN; N. RATNER (1992). «The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed in highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes». *Neuron*, núm. 8, pàg. 415-428.
- DECLUE, J. E.; A. G. PAPAGEORGE; J. A. FLETCHER; S. R. DIEHL; N. RATNER; W. C. VASS; D. R. LOWY (1992). «Abnormal regulation of mammalian *p21ras* contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis». *Cell*, núm. 69, pàg. 265-273.
- DECLUE, J. E.; B. D. COHEN; D. R. LOWY (1991). «Identification and characterization of the neurofi-

- bromatosis type 1 protein product». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, núm. 88, pàg. 9914-9918.
- DIEHL, S. R.; M. BOEHNKE; R. P. ERICKSON; A. B. BAXTER; M. A. BRUCE; J. L. LIEBERMAN; D. J. PLATT; L. M. PLOUGHMAN; K. A. SEILER; A. M. SWEET; F. S. COLLINS (1987). «Linkage analysis of von Recklinghausen neurofibromatosis to DNA markers on chromosome 17». *Genomics*, núm. 1, pàg. 361-363.
- DICK, G. (1992). «Disorders of myelin - natural history of multiple sclerosis». *J. R. Soc. Med.*, núm. 85, pàg. 424-425.
- EASTON, D. F.; M. A. PONDER; S. M. HUSON; B. A. J. PONDER (1993). «An analysis of variation in expression of neurofibromatosis type 1: Evidence for modifying genes». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 53, pàg. 305-313.
- EISENBARTH, L.; G. ASSUM; D. KAUFMANN; W. KRONE (1997). «Evidence for the presence of the second allele of the Neurofibromatosis type 1 gene in melanocytes derived from café au lait macules of NF1 patients». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, núm. 237, pàg. 138-141.
- ELYAKIM, S.; I. LERER; J. ZLOTOGORA; M. SAGI; Z. GELMAN-KOHAN; S. MERIN; D. ABELIOVICH (1994). «Neurofibromatosis type 1 (NF1) in Israeli families: linkage analysis as a diagnostic tool». *Am. J. Med. Genet.*, núm. 53, pàg. 325-334.
- ESTIVILL, X.; C. LÁZARO; T. CASALS; A. RAVELLA (1991). «Recurrence of a nonsense mutation in the NF1 gene causing classical neurofibromatosis type 1». *Hum. Genet.*, núm. 88, pàg. 185-188.
- FAIN, P. R.; D. E. GOLDBERG; M. R. WALLACE; F. S. COLLINS; E. WRIGHT; K. NGUYEN; D. F. BARKER (1989). «Refined physical and genetic mapping of the NF1 region on chromosome 17». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 45, pàg. 721-728.
- FEIGENBAUM, L.; K. FUJITA; F. S. COLLINS; G. JAY (1996). «Repression of the NF1 gene by Tax may explain the development of neurofibromas in human T-lymphotropic virus type 1 transgenic mice». *J. Virol.*, núm. 70, pàg. 3280-3285.
- FRIEDMAN, J. M.; P. BIRCH (1997). «An association between optic glioma and other tumours of the central nervous system in neurofibromatosis type 1». *Neuropediatrics*, núm. 28, pàg. 131-132.
- GASPARINI, P.; L. D'AGRUMA; G. P. DE CILLIS; P. BALESTRAZZI; R. MINGARELLI; L. ZELANTE (1996). «Scanning the first part of the neurofibromatosis type 1 gene by RNA-SSCP: identification of three novel mutations and of two new polymorphisms». *Hum. Genet.*, núm. 97, pàg. 492-495.
- GEIST, R. T.; D. H. GUTMANN (1996). «Expression of a developmentally-regulated neuron-specific isoform of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene». *Neurosci. Lett.*, núm. 211, pàg. 85-88.
- GOLUBIC, M.; M. ROUDEBUSH; S. DOBROWOLSKI; A. WOLFMAN; D. W. STACEY (1992). «Catalytic properties, tissue and intracellular distribution of neurofibromin». *Oncogene*, núm. 7, pàg. 2151-2159.
- GOLUBIC, M.; K. TANAKA; S. DOBROWOLSKI; D. WOOD; M. H. TSAI; M. MARSHALL; F. TAMANOI; D. W. STACEY (1991). «The GTPase stimulatory activities of the neurofibromatosis type 1 and the yeast IRA2 proteins are inhibited by arachidonic acid». *EMBO J.*, núm. 10, pàg. 2897-2903.
- GREGORY, P. E.; D. H. GUTMANN; A. MITCHELL; S. PARK; M. BOGUSKI; T. JACKS; D. L. WOOD; R. JOVE; F. S. COLLINS (1993). «Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules». *Somat. Cell Mol. Genet.*, núm. 19, pàg. 265-274.
- GUHA, A.; N. LAU; I. HUVAR; D. GUTMANN; J. PROVIAS; T. PAWSON; G. BOSS (1996). «Ras-GTP levels are elevated in human NF1 peripheral nerve tumors». *Oncogene*, núm. 12, pàg. 507-513.
- GUO, H.; I. THE; F. HANNAN; A. BERNARDS; Y. ZHONG (1997). «Requirement of *Drosophila* NF1 for activation cyclase by PACAP38-like neuropeptides». *Science*, núm. 276, pàg. 795-798.
- GUTMANN, D. H.; M. J. GIORDANO; D. K. MAHADEO, N. LAU; D. SILBERGELD; A. GUHA (1996). «Increased neurofibromatosis 1 gene expression in astrocytic tumors: positive regulation by p21-ras». *Oncogene*, núm. 12, pàg. 2121-2127.
- GUTMANN, D. H.; F. S. COLLINS (1993). «The neurofibromatosis type 1 gene and its protein product, Neurofibromin». *Neuron*, núm. 10, pàg. 335-343.
- GUTMANN, D. H.; L. B. ANDERSEN; J. L. COLE; M. SWAROOP; F. S. COLLINS (1993). «An alternatively-spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene is expressed in muscle». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 2, pàg. 989-992.
- GUTMANN, D. H.; F. S. COLLINS (1992). «Recent progress toward understanding the molecular biology of von Recklinghausen neurofibromatosis». *Ann. Neurol.*, núm. 31, pàg. 555-561.
- GUTMANN, D. H.; D. L. WOOD; F. S. COLLINS (1991). «Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, núm. 88, pàg. 9658-9662.
- HAJRA, A.; A. MARTÍN-GALLARDO; S. A. TARLÉ; M. FREDMAN; S. WILSON-GUNN; A. BERNARDS; F. S. COLLINS (1994). «DNA sequences in the promoter region of the NF1 gene are highly conserved between human and mouse». *Genomics*, núm. 21, pàg. 649-652.
- HAN, J. W.; F. MCCORMICK; I. G. MASARA (1991). «Regulation of Ras-GAP and Neurofibromatosis type 1 gene product by eicosanoids». *Science*, núm. 252, pàg. 576-579.
- HATTORI, S.; M. MASLAWA; S. NAKAMURA (1992). «Identification of neurofibromatosis type I gene product as an insoluble GTPase-activating protein toward ras p21». *Oncogene*, núm. 7, pàg. 481-485.

- HATTORI, S.; N. OHMI; M. MAEKAWA; M. HOSHINO; M. KAWAKITA; S. NAKAMURA (1991). «Antibody against neurofibromatosis type 1 gene product reacts with a triton-insoluble GTPase activating protein toward ras p21». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, núm. 177, pàg. 83-89.
- HEIM, R. A.; L. SILVERMAN; R. A. FARBER; L. N. W. KAM-MORGAN; M. C. LUCE (1994). «Screening for truncated NF1 proteins». *Nature Genet.*, núm. 8, pàg. 218-219.
- HEIM, R. A.; L. N. W. KAM-MORGAN; C. G. BINNIE; P. C. CORNS; M. C. CAYOUTTE; R. A. FARBER; A. S. AYLWORTH; L. M. SILVERMAN; M. C. LUCE (1995). «Distribution of 13 truncating mutations in the neurofibromatosis 1 gene». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 6, pàg. 975-981.
- HENKEMEYER, M.; D. J. ROSSI; D. P. HOLMYARD; M. C. PURI; G. MBAMALU; K. HARPAL; T. S. SHIH; T. JACKS; T. PAWSON (1995). «Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein». *Nature*, núm. 377, pàg. 695-701.
- HINRICHS, S. H.; M. NERENBERG; R. K. REYNOLDS; G. KHOURY; G. JAY (1987). «A transgenic mouse model for human neurofibromatosis». *Science*, núm. 237, pàg. 1340-1343.
- HOFFMEYER, S.; P. NÜRNBERG; H. RITTER; R. FAHSOLD; W. LEISTNER; D. KAUFMANN; W. KRONE (1998). «Nearby stop codons in exons of the neurofibromatosis type 1 gene are disparate splice effectors». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 62, pàg. 269-277.
- HOFFMEYER, S.; G. ASSUM; J. GRIESSER; D. KAUFMANN; P. NÜRNBERG; W. KRONE (1995). «On unequal allelic expression of the neurofibromin gene in neurofibromatosis type 1». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 4, pàg. 1267-1272.
- HOFMAN, K. J.; C. D. BOEHM (1992). «Familial neurofibromatosis type 1: clinical experience with DNA testing». *J. Pediatr.*, núm. 120, pàg. 394-398.
- HORIUCHI, T.; N. HATTA; M. MATSUMOTO; H. OHTSUKA; F. S. COLLINS; Y. KOBAYASHI; S. FUJITA (1994). «Nonsense mutations at Arg-1947 in two cases of familial neurofibromatosis type 1 in Japanese». *Hum. Genet.*, núm. 93, pàg. 81-83.
- HUSON, S. M.; D. CLARK; D. A. S. COMPSTON; P. S. HARPER (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.*, núm. 26, pàg. 704-711.
- HUSON, S. M.; R. A. C. HUGHES (1994). *The neurofibromatosis: a pathogenetic and clinical overview*. [s. l.]: Chapman & Hall Medical.
- IZAWA, I.; N. TAMAKI; H. SAYA (1996). «Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase». *FEBS Letters*, núm. 382, pàg. 53-59.
- JACKS, T.; T. S. SHIH; E. M. SCHMITT; R. T. BRONSON; A. BERNARDS; R. A. WEIBERG (1994). «Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1». *Nature Genet.*, núm. 7, pàg. 353-361.
- JADAYEL, D.; P. FAIN; M. UPADHYAYA; M. A. PONDER; S. M. HUSON; J. CAREY; A. FRYER; C. G. P. MATHEW; D. F. BARKER; B. A. J. PONDER (1990). «Paternal origin of new mutations in von Recklinghausen neurofibromatosis». *Nature*, núm. 343, pàg. 558-559.
- JOHNSON, M. R.; J. E. DECLUE; S. FELZMANN; W. C. VASS; G. XU; R. WHITE; D. R. LOWY (1994). «Neurofibromin can inhibit Ras-dependent growth by a mechanism independent of its GTPase-accelerating function». *Mol. Cell Biol.*, núm. 14, pàg. 641-645.
- KAYES, L. M.; W. BURKE; V. M. RICCARDI; R. L. BENNETT; P. EHRLICH; A. RUBENSTEIN; K. STEPHENS (1994). «Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 54, pàg. 424-436.
- KIM, H. A.; B. LING; N. RATNER (1997). «Nf1-deficient mouse Schwann cells are angiogenic and invasive and can be induced to hyperproliferate: reversion of some phenotypes by an inhibitor of farnesyl protein transferase». *Molec. Cell Biol.*, núm. 17, pàg. 862-872.
- KINSELLA B. T.; R. A. ERDMAN; W. A. MALTESE (1991). «Posttranslational modification of Ha-ras p21 by farnesyl versus geranylgeranyl isoprenoids is determined by the COOH-terminal amino acid». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, núm. 88, pàg. 8934-8938.
- KNUDSON, A. G. (1971). «Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, núm. 68, pàg. 820-823.
- KORF, B. R. (1997) *NNFF International NF1 Genetic Analysis Consortium Web site*. <http://www.clam.com/nf/nf1/gene/>
- KYRITIS, A. P.; P. Y. LEE; H. MOCHIZUKI; T. NISHI; V. A. LEVIN; H. SAYA (1992). «Differential splicing of the neurofibromatosis type 1 gene in the rat: splice variants homologous with the human are expressed in rat cells». *Int. J. Oncol.*, núm. 1, pàg. 149-152.
- LARGAESPADA, D. A.; C. I. BRANNAN; N. A. JENKINS; N. G. COPELAND (1996a). «Nf1 deficiency causes Ras-mediated granulocyte / macrophage colony stimulating factor hypersensitivity and chronic myeloid leukaemia». *Nature Genet.*, núm. 12, pàg. 137-143.
- LARGAESPADA, D. A.; C. I. BRANNAN; J. D. SHAUGHNESSY; N. A. JENKINS; N. G. COPELAND (1996b). «The Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor gene in myeloid leukemia». *Current topics in Microbiol. & Immunol.*, núm. 211, pàg. 233-239.
- LÁZARO, C.; A. GAONA; P. AINSWORTH; R. TENCONI; D. VIDAUD; H. KRUYER; E. ARS; V. VOLPINI; X. ESTIVILL (1996). «Sex differences in mutational rate and mutational mechanism in the NF1 gene in neurofibro-

- matosis type 1 patients». *Hum. Genet.*, núm. 98, pàg. 696-699.
- LÁZARO, C.; A. GAONA; A. RAVELLA; V. VOLPINI; X. ESTIVILL (1995a). «Prenatal diagnosis of neurofibromatosis type 1: from flanking RFLPs to intragenic microsatellite markers». *Prenatal Diagnosis*, núm. 15, pàg. 129-134.
- LÁZARO, C.; H. KRUYER; A. GAONA; X. ESTIVILL (1995b). «Two further cases of mutation R1947X in the NF1 gene: screening for a relatively common recurrent mutation» *Hum. Genet.*, núm. 96, pàg. 361-363.
- LÁZARO, C.; A. GAONA; X. ESTIVILL (1994b). «Two CA/GT repeat polymorphisms in intron 27 of the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene». *Hum. Genet.*, núm. 93, pàg. 351-352.
- LÁZARO, C.; A. RAVELLA; A. GAONA; V. VOLPINI; X. ESTIVILL (1994a). «Neurofibromatosis type 1 due to germline mosaicism in the clinically normal father». *N. Engl. J. Med.*, núm. 331, pàg. 1403-1407.
- LÁZARO, C.; A. GAONA; G. XU; R. WEISS; X. ESTIVILL (1993). «A highly informative CA/GT repeat polymorphism in intron 38 of the human neurofibromatosis type 1 (NF1) gene». *Hum. Genet.*, núm. 92; pàg. 429.
- LÁZARO, C.; A. RAVELLA; T. CASALS; V. VOLPINI; X. ESTIVILL (1992). «Prenatal diagnosis of sporadic neurofibromatosis 1». *The Lancet*, núm. 339, pàg. 119-20.
- LEDBETTER, D. H.; D. C. RICH; P. O'CONNELL; M. LEPPERT; J. C. CAREY (1989). «Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 44, pàg. 20-24.
- LEGIUS, E.; D. A. MARCHUK; F. S. COLLINS; T. W. GLOVER (1993). «Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumor suppressor gene hypothesis». *Nature Genet.*, núm. 3, pàg. 122-126.
- LEGIUS, E.; D. A. MARCHUK; B. K. HALL; L. B. ANDERSEN; M. R. WALLACE; F. S. COLLINS; T. W. GLOVER (1992). «NF1 related locus on chromosome 15». *Genomics*, núm. 13, pàg. 1316-1318.
- LEPPIG, K. A.; D. VISKOCHIL; S. NEIL; A. RUBENSTEIN; V. P. JOHNSON; X. L. ZHU; A. R. BROTHMAN; K. STEPHENS (1996). «The detection of contiguous gene deletions at the neurofibromatosis 1 locus with fluorescence in situ hybridization». *Cytogenet. Cell. Genet.*, núm. 72, pàg. 95-98.
- LI, S.; H. SATOH; T. WATANABE; S. NAKAMURA; S. HATTORI (1996). «cDNA cloning and chromosomal mapping of a novel human GAP (GAPIM), a GT-Pase-activating protein of Ras». *Genomics*, núm. 35, pàg. 625-627.
- LI, Y.; P. O'CONNELL; H. HUNTSMAN-BREIDENBACH; R. CAWTHON; J. STEVENS; G. SU; S. NEIL; M. ROBERTSON; R. WHITE; D. VISKOCHIL (1995). «Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene». *Genomics*, núm. 25, pàg. 9-18.
- LI, Y.; G. BOLLAG; R. CLARK; J. STEVENS; L. CONROY; D. FULTS (1992). «Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors». *Cell*, núm. 69, pàg. 275-281.
- LISTERNICK, R.; D. N. LOUIS; R. J. PACKER; D. H. GUTMANN (1997). «Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force». *Ann Neurol.*, núm. 41, pàg. 143-149.
- MAEKAWA, M.; S. LI; A. IWAMATSU; T. MORISHITA; K. YOKOTA; Y. IMAI; S. KOHSAKA; S. NAKAMURA; S. HATTORI (1994). «A novel mammalian Ras GTPase-activating protein which has phospholipid-binding and Btk homology regions». *Mol. Cell Biol.*, núm. 14, pàg. 6879-6885.
- MANTANI, A.; S. WAKASUGI; Y. YOKOTA; K. ABE; Y. USHIO; K. YAMAMURA (1994). «A novel isoform of the neurofibromatosis tpe-1 mRNA and a switch of isoforms during murine cell differentiation and proliferation». *Gene*, núm. 148, pàg. 245-251.
- MARCHUK D. A.; R. TAVAKKOL; M. R. WALLACE; B. H. BROWNSTEIN; P. TAILLON-MILLER; C.-T. FONG; E. LEGIUS; L. B. ANDERSEN; T. W. GLOVER; F. S. COLLINS (1992). «A yeast artificial chromosome contig encompassing the type 1 Neurofibromatosis gene». *Genomics*, núm. 13, pàg. 672-680.
- MARCHUK, D. A.; A. M. SAULINO; R. TAVAKKOL; M. SWAROOP; M. R. WALLACE; L. B. ANDERSEN; A. L. MITCHELL; D. H. GUTMANN; M. BOGUSKI; F. S. COLLINS (1991). «cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product». *Genomics*, núm. 11, pàg. 931-940.
- MARSHALL, C. J. (1996) «Ras effectors». *Curr. opin. cell biol.*, núm. 8, pàg. 197-204.
- MARTIN, G. A.; D. VISKOCHIL; G. BOLLAG; P. C. MCVABE; W. J. CROSIER; H. HAUBRUCK; L. CONROY; R. CLARK; P. O'CONNELL; R. CAWTHON; M. A. INNIS; F. MCCORMICK (1990). «The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21». *Cell*, núm. 63, pàg. 843-849.
- MARU, Y.; O. N. WITTE (1991). «The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon». *Cell*, núm. 67, pàg. 459-468.
- MCINTOSH, I.; A. HAMOSH; H. DIETZ (1993). «Nonsense mutations and diminished mRNA levels». *Nature Genet.*, núm. 4, pàg. 219.
- MENON A. G.; K. M. ANDERSON; V. M. RICCARDI; R. Y. CHUNG; J. M. WHALEY; D. W. YANDELL; G. E. FARMER; R. N. FREIMAN; J. K. LEE; F. P. LI; D. F. BARKER; D. H. LEDBETTER; A. KLEIDER; R. L. MARTUZA; J. F. GUSELLA; B. R. SEIZINGER (1990). «Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the forming of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, núm. 87, pàg. 5435-5439.
- MENON, A. G.; D. H. LEDBETTER; D. C. RICH; B. R. SEI-

- ZINGER; G. A. ROULEAU; V. V. MICHELS; M. A. SCHMIDT; G. DEWALD; C. M. DALLATORRE; J. L. HAINES; J. F. GUSELLA (1989). «Characterization of a translocation within the von Recklinghausen neurofibromatosis region of chromosome 17». *Genomics*, núm. 5, pàg. 245-249.
- MESSIAEN, L.; T. CALLENS; A. D. PAEPE; M. CRAEN; G. MORTIER (1997). «Characterisation of two different nonsense mutations, C6792A and C6792G, causing skipping of exon 37 in the NF1 gene». *Hum. Genet.*, núm. 101, pàg. 75-80.
- MIKOL, D. D.; J. R. GULCHER; K. J. STEFANSSON (1990). «The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate». *Cell Biol.*, núm. 110, pàg. 471-9.
- MUNTANER, J. (1996) «Estudio de la inducción combinada de lesiones melánicas y tumores del sistema nervioso periférico por exposición transplacentaria a la N-etil-N-nitrosourea en el hamster dorado sirio». Tesi doctoral. Universitat de Barcelona.
- NAKAMURA, T.; T. NEMOTO; M. ARAI; Y. YAMAZAKI; T. KASUGA; D. H. GUTMANN; F. S. COLLINS; T. ISHIKAWA (1994a). «Specific expression of the neurofibromatosis type 1 gene (NF1) in the hamster Schwann cell». *Am. J. Pathol.*, núm. 144, pàg. 549-555.
- NAKAMURA, T.; T. USHIJIMA; Y. ISHIZAKA; M. NAGAO; T. NEMOTO; M. HARA; T. ISHIKAWA (1994b). «Neu proto-oncogene mutation is specific for the neurofibromas in a N-nitroso-N-ethylurea-induced hamster neurofibromatosis model but not for hamster melanomas and human Schwann cell tumors». *Cancer Res.*, núm. 54, pàg. 976-980.
- NAKAMURA, T.; M. HARA; T. KASUGA (1989). «Transplacental induction of peripheral nervous tumor in the Syrian golden hamster by N-nitroso-N-ethylurea. A new model for von Recklinghausen's neurofibromatosis». *Am. J. Pathol.*, núm. 135, pàg. 251-259.
- NIH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT (1988). «Neurofibromatosis». *Arch. Neurol.*, núm. 45, pàg. 575-578.
- NISHI, T.; P. S. Y. LEE; K. OKA; V. A. LEVIN; S. TANASE; Y. MORINO; H. SAYA (1991). «Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation». *Oncogene*, núm. 6, pàg. 1555-1559.
- NORLUND, M.; X. GU; M. T. SHIPLEY; N. RATNER (1993). «Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons». *J. Neurosci.*, núm. 13, pàg. 1588-1600.
- NUR-E-KAMAL, M. S.; M. VARGA; H. MARUTA (1993). «The GTPase activating NF1 fragment of 91 amino acids reserves v-Ha-Ras-induced malignant phenotype». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 22331-22337.
- O'CONNELL, P.; R. LEACH; R. M. CAWTHON; M. CULVER; J. STEVENS; D. VISKOCHIL; R. E. K. FOURNIER; D. C. RICH; D. H. LEDBETTER; R. WHITE (1989). «Two NF1 translocations map within a 600-kb segment of 17q11.2». *Science*, núm. 244, pàg. 1087-1088.
- PELTZ, S. W.; G. BREWER; R. BERNSTEIN; R. KRATZKE; J. ROSS (1991). «Regulation of mRNA turnover in eukaryotic cells». *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.*, núm. 1, pàg. 99-112.
- PELTZ, S. W.; J. L. DONAHUE; A. JACOBSON (1992). «A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol. Cell Biol.*, núm. 12, pàg. 5778-5784.
- PERANTONI, A. O.; J. M. RICE; C. D. REED; M. WATATANI; M. L. WENK (1987). «Activated neu oncogene sequences in primary tumors of the peripheral nervous system induced in rats by transplacental exposure to ethylnitrosourea». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, núm. 84, pàg. 6317-6321.
- POULLET, P.; B. LIN; K. ESSON; F. TAMANOI (1994). «Functional significance of lysine 1423 of neurofibromin and characterisation of a second site suppressor which rescues mutations at this residue and suppresses Ras2Val-19-activated phenotype». *Mol. Cell Biol.*, núm. 14, pàg. 815-821.
- PREISER, S. A.; C. B. DAVENPORT (1918). «Multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen disease) and its inheritance». *Am. J. Med. Sci.*, núm. 156, pàg. 507-541.
- RICCARDI, V. M.; J. E. EICHNER (1992). *Neurofibromatosis: Phenotype, Natural History and pathogenesis*. 2ª ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- RICCARDI, V. M.; R. A. LEWIS (1988). «Penetrance of von Recklinghausen neurofibromatosis: a distinction between predecessors and descendants». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 42, pàg. 284-289.
- ROBINSON, P. N.; A. BÖDDRICH; H. PETERS; S. TINSCHERT; A. BUSKE; D. KAUFMANN; P. NÜRNBERG (1995). «Two recurrent nonsense mutations and a 4bp deletion in a quasi-symmetric element in exon 37 of the NF1 gene». *Hum. Genet.*, núm. 96, pàg. 95-98.
- RODENHISER, D. I.; P. J. AINSWORTH; M. B. COULTER-MACKIE; S. M. SINGH; J. H. JUNG (1993). «A genetic study of neurofibromatosis type 1 (NF1) in southwestern Ontario. II A PCR based approach to molecular and prenatal diagnosis using linkage». *J. Med. Genet.*, núm. 30, pàg. 363-368.
- ROUDEBUSH, M.; T. SLABE; V. SUNDARAM; C. L. HOPPEL; M. GOLUBIC; D. W. STACEY (1997). «Neurofibromin colocalizes with mitochondria in cultured cells». *Exp. cell res.*, núm. 236, pàg. 161-172.
- RUBENSTEIN, A. E (1984). «Neurological complications in 250 cases of neurofibromatosis». *Ann. Neurol.*, núm. 16, pàg. 133.
- SAMUELSSON, B.; R. AXELSSON (1981). «Neurofibromatosis. A clinical and genetic study of 96 cases in Gothenburg, Sweden». *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh)*, núm. 95, pàg. 67-71.

- SARTIN, E. A.; S. E. DORAN; M. G. RIDDELL; G. A. HERRE-  
RA; G. S. TENNYSON; G. D'ANDREA, R. D. WHITLEY;  
F. S. COLLINS (1994). «Characterization of naturally  
occurring cutaneous neurofibromatosis in Hol-  
stein cattle. A resembling neurofibromatosis type 1  
in humans». *Am J Pathol.*, núm. 145, pàg. 1168-1174.
- SAWADA, S.; S. FLORELL; S. M. PURANDARE; M. OTA; K.  
STEPHENS; D. VISKOCHIL (1996). «Identification of  
NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofi-  
broma». *Nature Genet.*, núm. 14, pàg. 110-112.
- SCHMALE, M. C.; M. R. AMAN; K. A. GILL (1996). «A re-  
trovirus isolated from cell lines from neurofibro-  
mas in bicolor damselfish (*Pomacentrus partitus*)». *J.  
General Virol.*, núm. 77, pàg. 1181-1187.
- SCHMALE, M. C.; G. T. HENSLEY (1988). «Transmissibility  
of a neurofibromatosis-like disease in bicolor dam-  
selfish». *Can. Res.*, núm. 48, pàg. 3828-3833.
- SCHMALE, M. C.; G. T. HENSLEY; L. R. UDEY (1986).  
«Neurofibromatosis in the bicolor damselfish (*Po-  
macentrus partitus*) as a model of von Recklinghaus-  
en neurofibromatosis». *Ann. NY. Acad. Sci.*, núm.  
486, pàg. 386-402.
- SCHMIDT, M. A.; V. V. MICHELS; G. W. DEWALD (1987).  
«Cases of neurofibromatosis with rearrangements  
of chromosome 17 involving band 17q11.2». *Am. J.  
Med. Genet.*, núm. 28, pàg. 771-777.
- SEIZINGER, B. R.; G. A. ROULEAU; A. H. LANE; G. FARMER;  
L. J. OZELIUS; J. L. HAINES; D. M. PARRY; B. R. KORE; M.  
A. PERICAK-VANCE; A. G. FARYNIARZ; W. J. HOBBS; J.  
A. IANNAZZI; J. C. ROY; A. MENON; J. L. BADER; M. A.  
SPENCE; M. V. CHAO; J. J. MULVIHILL; A. D. ROSES; R.  
L. MARTUZA; X. O. BREAKFIELD; P. M. CONNELLY; J.  
F. GUSELLA (1987). «Genetic linkage of von Reckling-  
hausen neurofibromatosis to the nerve growth factor  
receptor gene». *Cell*, núm. 49, pàg. 589-594.
- SERGEYEV, A. S. (1975). «On the mutation rate of neu-  
rofibromatosis». *Hum. Genet.*, núm. 28, pàg. 129-  
138.
- SERRA, E.; S. PUIG; D. OTERO; A. GAONA; H. KRUYER; E.  
ARS; X. ESTIVILL; C. LÁZARO (1997). «Confirmation  
of a double-hit model for the NF1 gene in benign  
neurofibromas». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 61, pàg.  
512-519.
- SHANNON, K. M.; P. O'CONNELL; G. A. MARTIN; D. PA-  
DERANGA; K. OLSON; P. DINNDORF; F. MCCORMICK  
(1994). «Loss of normal NF1 allele from the bone  
marrow of children with type 1 neurofibromatosis  
and malignant myeloid disorders». *N. Engl. J. Med.*,  
núm. 330, pàg. 597-601.
- SHEN, M. H.; P. S. HARPER; M. UPATHYAYA (1996).  
«Molecular genetics of neurofibromatosis type 1  
(NF1)». *J. Med. Genet.*, núm. 33, pàg. 2-17.
- SIDE, L.; B. TAYLOR; M. CAYOUILLE; E. CONNER; P.  
THOMPSON; M. LUCE; K. SHANNON (1997). «Ho-  
mozygous inactivation of the NF1 gene in bone  
marrow cells from children with neurofibromato-  
sis type 1 and malignant myeloid disorders». *N.  
Engl. J. Med.*, núm. 336, pàg. 1713-1720.
- SILVA, A. J.; P. W. FRANKLAND; Z. MAROWITZ; E. FRIED-  
MAN; G. LAZLO; D. CIOFFI; T. JACKS; R. BOURTCHU-  
LADZE (1997). «A mouse model for the learning and  
memory deficits associated with neurofibromato-  
sis type 1». *Nat. Genet.*, núm. 15, pàg. 281-284.
- SKOLNICK, M. H.; B. PONDER; B. SEIZINGER (1987). «Lin-  
kage of NF1 to 12 chromosome 17 markers: a sum-  
mary of eight concurrent reports». *Genomics*, núm.  
1, pàg. 382-383.
- SKUSE, G. R.; A. J. CAPPIONE (1997). «RNA processing  
and clinical variability in neurofibromatosis type 1  
(NF1)». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 6, pàg. 1707-1712.
- SKUSE, G. R.; A. J. CAPPIONE; M. SOWDEN; L. J. ME-  
THENY; H. C. SMITH (1996). «The neurofibromatosis  
type 1 messenger RNA undergoes base-modifica-  
tion RNA editing». *Nucleic Acids Res.*, núm. 24, pàg.  
478-485.
- SKUSE, G. R.; B. A. KOSCIOLEK; P. T. ROWLEY (1991).  
«The neurofibroma in von Recklinghausen Neuro-  
fibromatosis has a unicellular origin». *Am. J. Hum.  
Genet.*, núm. 49, pàg. 600-607.
- SKUSE, G. R.; B. A. KOSCIOLEK; P. T. ROWLEY (1989).  
«Molecular genetic analysis of tumors in von Reck-  
linghausen neurofibromatosis: loss of heterozy-  
gosity for chromosome 17». *Genes Chromosomes  
Cancer*, núm. 1, pàg. 36-41.
- STEPHENS, K.; L. KAYES; V. M. RICCARDI; M. RISING; V.  
P. SYBERT; R. A. PAGON (1992). «Preferential muta-  
tion of the neurofibromatosis type 1 gene in pater-  
nally derived chromosomes». *Hum. Genet.*, núm.  
88, pàg. 279-282.
- SUZUKI, H.; K. TAKAHASKI; Y. KUBOTA; S. SHIBAHARA  
(1992). «Molecular cloning of a cDNA coding for  
neurofibromatosis type 1 protein isoform lacking the  
domain related to ras GTPase-activating protein».  
*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, núm. 187, pàg.  
984-990.
- SUZUKI, Y.; H. SUZUKI; T. KAYAMA; T. YOSHIMOTO; S.  
SHIBAHARA (1991). «Brain tumors predominantly  
express the neurofibromatosis type 1 gene trans-  
cripts containing the 63 base insert in the region cod-  
ing for GTPase activating protein-related do-  
main». *Biochem. & Biophys. Res. Com.*, núm. 181,  
pàg. 955-961.
- TAKAHASHI, K.; H. SUZUKI; T. KAYAMA; Y. SUKI; T. YO-  
SHIMOTO; H. SASANO; S. SHIBAHARA (1994). «Multi-  
ple transcripts of the neurofibromatosis type 1  
gene in human brain and in brain tumours». *Clin.  
Sci.*, núm. 87, pàg. 481-485.
- THE, I.; G. E. HANNIGAN; G. S. COWLEY; S. REGINALD; Y.  
ZHONG; J. F. GUSELLA; I. K. HARIHARAN; A. BER-  
NARDS (1997). «Rescue of a *Drosophila* NF1 mutant  
phenotype by protein kinase A». *Science*, núm. 276,  
pàg. 791-794.

- THE, I.; A. E. MURTHY; G. E. HANNIGAN; L. B. JACOBY; A. G. MENON; J. F. GUSELLA; A. BERNARDS (1993). «Neurofibromatosis type 1 gene mutations in neuroblastoma». *Nature Genet.*, núm. 3, pàg. 62-66.
- TRAHEY, M.; F. MCCORMICK (1987). «A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants». *Science*, núm. 238, pàg. 542-545.
- UPADHYAYA, M.; A. FRYER; J. MACMILLAN; S. M. HUSON; P. S. HARPER (1992). «Prenatal diagnosis and presymptomatic detection of neurofibromatosis type 1». *J. Med. Genet.*, núm. 29, pàg. 180-183.
- UPADHYAYA, M.; S. H. ROBERTS; J. MAYNARD; E. SOUROY; P. W. THOMPSON; M. VAUGHAN; A. O. M. WILKIE; H. E. HUGHES (1996). «A cytogenetic deletion, del(17)(q11.22q21.1), in a patient with sporadic neurofibromatosis type 1 (NF1) associated with dysmorphism and developmental delay». *J. Med. Genet.*, núm. 33, pàg. 148-152.
- VALERO, M. C.; E. VELASCO; F. MORENO; C. HERNÁNDEZ-CHICO (1994). «Characterization of four mutations in the neurofibromatosis type 1 gene by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 3, pàg. 639-641.
- VISKOCHIL, D.; A. M. BUCHBERG; G. XU; R. M. CAWTHON; J. STEVENS; R. K. WOLFF; M. CULVER; J. C. CAREY; N. G. COPELAND; N. A. JENKINS; R. WHITE; P. O'CONNELL (1990). «Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus». *Cell*, núm. 62, pàg. 187-192.
- VON RECKLINGHAUSEN, F. D. (1882). *Ueber die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiple Neuomen*. Berlin: Hirschwald.
- WALLACE, M. R.; A. MARCHUK; L. B. ANDERSEN; R. LETCHER; H. M. ODEH; A. M. SAULINO; J. W. FOUNTAIN; A. BRERETON; J. NICHOLSON; A. L. MITCHELL; B. H. BROWNSTEIN; F. S. COLLINS (1990). «Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients». *Science*, núm. 249, pàg. 181-186.
- WARD, K.; P. O'CONNELL; J. CAREY; M. LEPPERT; S. JO-LLEY; R. PLAETKE; B. OGDEN; R. WHITE (1990). «Diagnosis of neurofibromatosis 1 by using tightly linked, flanking markers». *Am. J. Hum. Genet.*, núm. 46, pàg. 943-949.
- WU, B. L.; G. H. SCHNEIDER; B. R. KORF (1997). «Deletion of the entire NF1 gene causing distinct manifestations in a family». *Am. J. Med. Genet.*, núm. 69, pàg. 98-101.
- WU, B. L.; M. A. AUSTIN; G. H. SCHNEIDER; R. G. BOLES; B. R. KORF (1995). «Deletion of the entire NF1 gene detected by FISH: four deletion patients associated with severe manifestations». *Am. J. Med. Genet.*, núm. 59, pàg. 528-535.
- XU, G.; P. O'CONNELL; D. VISKOCHIL; R. CAWTHON; M. ROBERTSON; M. CULVER; D. DUNN; J. STEVENS; R. GESTELAND; R. WHITE; R. WEISS (1990a). «The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP». *Cell*, núm. 62, pàg. 599-608.
- XU, G.; B. LIN; K. TANAKA; D. DUNN; D. WOOD; R. GESTELAND; R. WHITE; R. WEISS; F. TAMANOI (1990b). «The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements *ira* mutants of *S. cerevisiae*». *Cell*, núm. 63, pàg. 835-841.
- XU, G.; L. NELSON; P. O'CONNELL; R. WHITE (1991). «An Alu polymorphism intragenic to the neurofibromatosis type 1 gene (NF1)». *Nucleic Acids Res.*, núm. 19, pàg. 3764.
- XU, W.; L. M. MULLIGAN; M. A. PONDER; L. LIU; B. A. SMITH; C. G. P. MATHEW; B. A. J. PONDER (1992). «Loss of NF1 alleles in pheochromocytomas from patients with type 1 neurofibromatosis». *Genes, Chrom Cancer*, núm. 4, pàg. 337-342.
- XU, H.; D. H. GUTMANN (1997). «Mutations in the GAP-related domain impair the ability of neurofibromin to associate with microtubules». *Brain Res.*, núm. 759, pàg. 149-152.
- YOSHIDA, M.; T. SUZUKI; J. FUJISAWA; H. HIRAI (1995). «HTLV-1 oncoprotein tax and cellular transcription factors». *Curr Top Microbiol Immunol.*, núm. 193, pàg. 79-89.