

# Aktueller Stand der molekulargenetischen Diagnostik bei Neurofibromatose Typ 2

Lan Kluwe<sup>1</sup>, Victor-F. Mautner<sup>2</sup>

1 Labor für Hirntumorbiologie, Neurochirurgie, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Hamburg

2 Neurofibromatose Ambulanz, Klinikum Nord Ochsenzoll, Hamburg

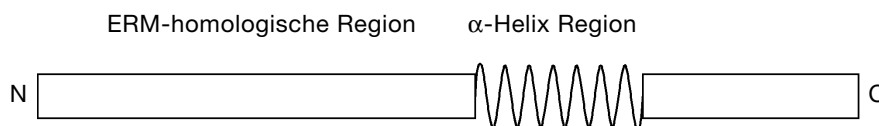


Abb 1 Das *nf2*-Genprodukt, Schwannomin oder Merlin

## Klinisches Bild der NF2

Neurofibromatose 2 (NF2) ist eine Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird und durch Neoplasie von Zellen der Neuralleiste gekennzeichnet ist. Individuen, die diesen Gendefekt tragen, zeigen eine Prädisposition für verschiedene Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems sowie für ophthalmologische Abnormalitäten. Bilaterale vestibuläre Schwannome sind ein Hauptmerkmal der NF2 und treten bei 85% der NF2-Patienten auf<sup>1-3</sup>.

Am häufigsten treten neben bilateralen vestibulären Schwannomen spinale Tumore (Schwannome, Meningeome, Ependymome und Astrozytome) bei NF2 auf<sup>4</sup>. Darüber hinaus sind periphere Schwannome, kutane Schwannome und selten Neurofibrome als Erstzeichen der Erkrankung insbesondere im Kindesalter von Relevanz. Im Kindesalter sind kutane Schwannome und die subkapsuläre Katarakt häufig subtile Erstsymptome. Vestibuläre Schwannome sind kernspintomographisch häufig ab einem Alter von 10 Jahren nachweisbar, meist jedoch asymptomatisch. Bei den meisten Betroffenen treten Erstsymptome (zerebrale bzw. spinale Raumforderungen und assoziierte Symptome) im Alter von 17 Jahren auf, die durch eine relativ schnelle Progression gekennzeichnet sind. Demgegenüber steht eine vergleichsweise kleine Patientengruppe, die durch langsame Tumorprogression und wenig assoziierte Symptome charakterisiert ist. Daneben werden sogenannte atypische Verlaufsformen beobachtet, die durch eine inkomplette Merkmalsausprägung charakterisiert sind. An NF2

sollte differentialdiagnostisch gedacht werden, wenn im jungen Lebensalter ein solitäres vestibuläres Schwannom vorliegt, wenn multiple Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems vorhanden sind, wenn eine subkapsuläre Linsentrübung oder retinale Veränderungen diagnostisch nicht zugeordnet werden können, wenn multiple spinale Tumore ohne Irisknötchen auftreten, und wenn Schwannome der Haut und der peripheren Nerven auftreten. Vor kurzem hat der medizinische-wissenschaftliche Beirat der NNFF (National NF Foundation) eine Erweiterung der diagnostischen Kriterien der NIH Konferenz vorgeschlagen (Tab 1)<sup>5</sup>.

Innerhalb einer NF2-Familie ist der Phänotyp oft homogen. In den letzten Jahren wurden jedoch einige Familien beschrieben, deren Phänotyp intrafamiliär stark divergierte. Mosaikbildung und Spleißsequenz-Mutationen, die oft mit variablen Phänotypen korreliert sind, dürften die intrafamiliäre phänotypische Variabilität erklären.

## Das *nf2* Tumorsuppressorgen

Das *nf2*-Gen erstreckt sich über 110 kb auf der Chromosomenregion 22q11.2 und besteht aus 16 und einem wahlweise gespleißtem Exon. Das *nf2*-Genprodukt, Schwannomin oder Merlin, ist ein Protein aus 595 Aminosäuren, dessen Sequenz Homologien mit der Proteinfamilie des ERM Protein aufweist<sup>6,7</sup> (Abb 1). Es wird angenommen, daß diese Proteine die Zellmembran mit dem Zytoskelett verbinden. So ist das *nf2*-Genprodukt das erste Tumorsuppressorprotein des

Menschen, das eine Funktion als Verbindungsprotein besitzt. Ein Defekt in diesem Protein könnte zur Zerstörung der Zellstruktur führen und dadurch die Zell-zu-Zell-Kommunikation verhindern und übermäßiges Zellwachstum hervorrufen.

Da das *nf2*-Gen ein Tumorsuppressorgen ist, müssen bei Tumorentstehung beide Allele des Gens inaktiviert werden. D.h., die Wirkung eines Defektes in dem *nf2*-Gen ist rezessiv. Bei einem NF2-Patienten, der einen Defekt in einem *nf2*-Allel geerbt hat, trägt jede Zelle diesen Defekt. Nur eine zusätzliche genetische Änderung auf dem zweiten *nf2*-Allel reicht aus, um einen Tumor hervorzurufen. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit, daß in den monoallelisch mutierten Zellen weitere Änderungen vorkommen und sich als Konsequenz multiple Tumoren entwickeln. In der Tat ist die Penetranz der Erkrankung bei NF2 beinahe vollständig (ausgenommen bei Spleiß-Mutationen, deren Wirkung weniger als 100% ist), und erscheint somit bei einem vererbten Gendefekt als dominante Erkrankung.

## *nf2*-Mutationensanalyse

Die Mutationsanalyse wird heute hauptsächlich durch Exon-Untersuchungen durchgeführt<sup>8,9</sup>. Mit genomischer DNA aus Blut als Ausgangsmaterial werden die amplifizierten Exons des *nf2*-Gens mit Hilfe von SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) oder TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) analysiert. Die Autoren verwenden die TGGE-Methode, die auf der Ther-

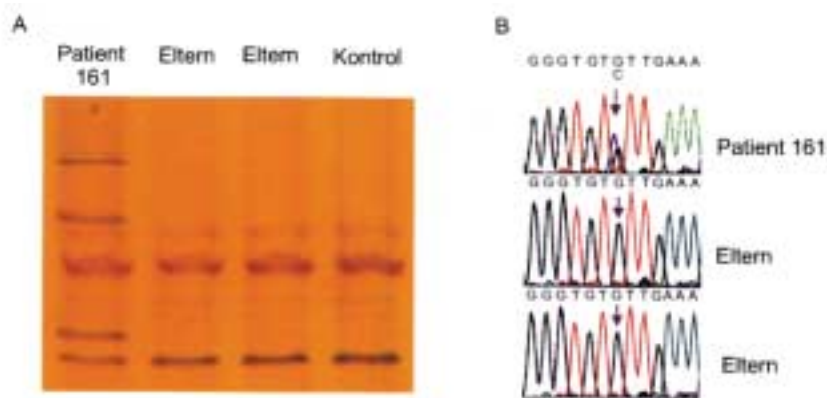


Abb 2 Eine Mutation im Exon 7

A Mutationsmuster nach der TGGE. Das von dem Patienten amplifizierte Exon 7-DNA-Fragment zeigt zwei Homoduplexes und zwei Heteroduplexes, während die Exon-7-Fragmente der gesunden Eltern nur ein Homoduplex zeigen.

B Die direkte Sequenzierung zeigt eine Punktmutation in der Spleiß-Sequenz des Exon 7.

mostabilität des DNA-Doppelstrangs basiert und für die Suche nach kleinen Änderungen wie Punktmutationen gut geeignet ist (Exemplarisches Mutationsmuster in Abbildung 2 für Exon 7 dargestellt)<sup>10</sup>. Die Exons 1 bis 15 des *nf2*-Gens werden untersucht. Exons, die ein verändertes TGGE-Muster zeigen, werden erneut amplifiziert und sequenziert.

Bisher wurden in unserem Labor Blut-DNA-Proben von mehr als 100 nicht miteinander verwandten familiären und sporadischen NF2-Patienten analysiert. In 55% der Fälle konnten Mutationen mittels TGGE-Analyse gefunden werden. In Familien mit NF2 liegt die Mutationsnachweisrate derzeit bei 81%. Dieser Unterschied der Mutationsnachweisrate zwischen familiären und sporadischen Formen der Erkrankung kann durch Mosaikbildung in einem Teil der sporadischen Patienten erklärt werden.

In den über 200 bisher publizierten Mutationen in NF2-Patienten sind die meisten Nonsense-Mutationen oder Leserasterverschiebungen (ca. 65%), die zu unvollständigen *nf2*-Genprodukten führen. Missense-Mutationen, die den Austausch von einzelnen Aminosäuren zur Folge haben, und Deletionen bzw. Insertionen, die keine Leserasterverschiebung verursachen, traten in nur ca. 10% der Fälle auf. Die restlichen Mutationen (ca. 25%) sind Änderungen in der Spleiß-Sequenz. Die Mutationen befinden sich in Exon 1 bis 15 des *nf2* Gens (Abb 3). In Exon 16 oder 17 wurde bisher keine Mutation gefunden. Hot-Spots für Mutationen sind nicht bekannt.

Für NF2-Patienten und Personen, bei denen der Verdacht auf NF2 besteht, bietet sich die genetische Diagnostik aus folgenden Gründen an:

- (a) sie kann Informationen über den möglichen weiteren klinischen Verlauf der Erkrankung liefern (siehe Geno-Phänotyp-Korrelation) und damit Einfluß auf die klinische Betreuung haben. Dies gilt auch für die Entscheidung über die Versorgung von Patienten mit Hirnstammimplantaten.
- (b) die präsymptomatische Diagnostik erlaubt die Identifikation von Nachkommen der Betroffenen, die das defekte *nf2*-Allel tragen, und verhindert damit unnötige Untersuchungen bei Nichtbetroffenen. Dadurch wird eine adäquate klinische und psychosoziale Betreuung ermöglicht, zumal Kinder die sogenannten diagnostischen Kriterien nicht immer erfüllen.
- (c) sie erlaubt die pränatale Diagnostik

#### Nicht identifizierte Mutationen bei NF2-Patienten – mögliche Erklärungen und neue Strategien

Bei der Exon-Untersuchung von Blut-DNA liegt die Mutationsnachweisrate zwischen 35 bis 65%, je nach Patientenkollektiv. Z.B. wird NF1 immer noch häufig mit NF2 verwechselt oder keine exakte klinische Diagnostik vor einer Mutationsanalyse eingeleitet. Darüber hinaus sind keine *nf2* Mutationen in der Blut-DNA bei Schwannomatose oder Meningeomatose nachzuweisen, die differentialdiagnostisch zu erwägen sind. Weiterhin gibt es verschiedene plausible Erklärungen für nicht identi-

fizierte Mutationen:

#### Mosaikbildung

Bei 50% bis 80% der NF2 Patienten tritt die Erkrankung sporadisch auf<sup>1-3</sup>. Sie sind Träger von de novo Mutationen. Die Mutationen könnten in den elterlichen Keimbahnzellen entstanden sein, ebenso ist eine spätere Mutationsentstehung während der Embryonalentwicklung möglich. Diese würde zu einer Mosaikbildung führen, d.h. nur ein Teil der Körperzellen des Betroffenen trüge die Mutation. Wenn die Lymphozyten von einem Betroffenen die Mutation nicht tragen, kann durch Analyse der Blut-DNA die Mutation nicht gefunden werden. Somit kann Mosaikbildung in einem Teil der Patienten mit sporadischer NF2 die unterschiedliche Mutationsnachweisrate in familiären Fällen (81%) versus sporadischer Fälle (51%) erklären. Für Patienten mit sporadischer NF2, deren Lymphozyten-DNA keine *nf2*-Mutation aufweist, ist die Untersuchung von verschiedenem Tumorgewebe sinnvoll. Die Aufdeckung ein und derselben Mutation in mehreren Tumoren bei einem Patienten würde darauf hinweisen, daß diese Mutation konstitutionell ist. Es konnte im Rahmen unserer Studien die gleiche Mutation wiederholt in multiplen Tumoren bei einem Patienten nachgewiesen werden, die jedoch in der entsprechenden Blut-DNA fehlte. So können Untersuchungen multipler Tumoren bei einem Patienten zusätzliche Möglichkeiten bieten, bei Mosaikbildung konstitutionelle Mutationen aufzudecken.

#### In Intron liegende Mutationen

**Tab 1 Revidierte diagnostische Kriterien für NF2<sup>2</sup>**

Gesicherte Diagnose einer NF2 bei	Verdacht auf NF2 bei
* Bilateralen vestibulären Schwannomen (VS)	* Unilateralen VS (bei Patienten <30 Jahre) sowie einer der Folgenden: Meningeom, Gliom, Schwannom, Katarakt
oder * Familiärer Vorgeschichte der Erkrankung	oder * Multiplen Meningeomen
sowie 1. Unilateralen VS (bei Patienten <30 Jahre)	sowie 1. Unilateralen VS (bei Patienten <30 Jahre)
oder 2. Vorliegen einer der Folgenden: Meningeom, Gliom, Katarakt	oder 2. Einer der Folgenden: Gliom, Schwannom, Katarakt

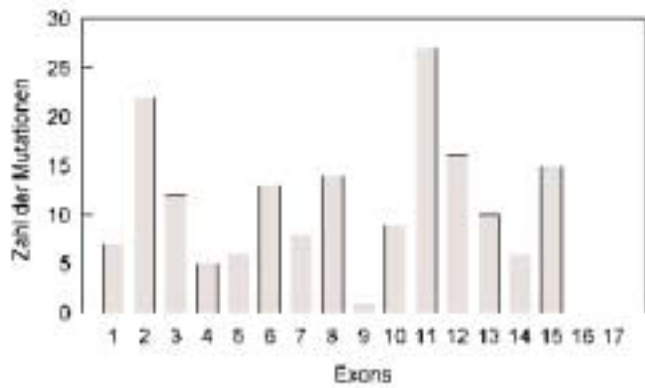


Abb 3 Verteilung der Mutationen in den Exons des *nf2*-Gens

Bei der Exon-Untersuchung werden nur die Exon-Sequenzen und kurze Intronsequenzen, die unmittelbar neben den Exons liegen, untersucht. Mutationen, die weiter von den Exons entfernt liegen, werden nicht auf das Vorliegen von Mutationen geprüft und übersehen. Intron-Mutationen wurden inzwischen auch wiederholt beschrieben<sup>10</sup>. Vor kurzem wurde eine Intron-Mutation, die über 200 bp von Exon 5 entfernt ist und ein neues zusätzliches Exon hervorruft, beschrieben. Es ist anzunehmen, daß noch mehrere Mutationen in den Introns lokalisiert sind, die jedoch von dem bisherigen Exon-Screening übersehen wurden. Diese Mutationen können einem Teil der *nf2*-Mutationen entsprechen, die wir aufgrund unserer Methode nicht detektieren konnten. Um diese Mutationen aufzudecken, ist die Analyse des *nf2*-Transkriptes erforderlich. Wir haben ein System etabliert, womit wir das vollständige *nf2*-Transkript aus Lymphozyten-RNA gewinnen können und erwarten, intronische Mutationen, die das Spleißen des *nf2*-Transkriptes beeinflussen, durch eine RT (Reverse-Transkription)-PCR Analyse aufdecken zu können.

### Große Deletionen

Deletionen, die mehrere Exons oder gar die gesamte *nf2*-kodierende Region umspannen, werden ebenfalls bei der Exon-Untersuchung nicht identifiziert. Diese Art von Deletionen im *nf2*-Gen wurde bereits beschrieben. Bisher fehlen jedoch systematische Untersuchungen zur Häufigkeit dieser genetischen Veränderungen bei NF2, so daß deren Frequenz offen ist. Geno-Phänotyp Korrelation bei NF2

Die bisher publizierten Studien über *nf2*-Keimbahnmutationen und deren korrelierende klinische Daten ermöglichen inzwischen vorläufige Aussagen zur Geno-Phänotyp-Korrelation bei NF2:

- Nonsense und Leserasterverschiebende Mutationen, die zu unvollständigen Gen-Produkten führen, sind mit schweren Phänotypen assoziiert.
- Mutationen, die den Spleiß-Prozess des *nf2*-Transkriptes beeinflussen, sind mit unterschiedlichen Phänotypen assoziiert. Bei diesem Mutationstyp ist eine intrafamiliäre Variabilität des Phänotyps häufig zu beobachten. Die Variabilität der Spleiß-Mutationen konnte durch deren komplexe Wirkungen geklärt werden. Die Konsequenz einer Spleiß-Mutation, z.B. das Überspringen eines Exons und/oder das Benutzen von kryptischen Spleiß-Sequenzen, ist in den meisten Fällen nicht zu 100% penetrant. Je nachdem wieviel normale gespleißte Transkripte vorhanden sind, können die Phänotypen stark oder schwach ausgeprägt sein.
- Nicht-proteinverkürzende Mutationen, d.h. Missense Mutationen oder In-Frame-Deletionen, sind oft mit leichten Phänotypen assoziiert. Aufgrund der geringen Zahl dieser Mutationstypen ist eine klare Aussage zur Zeit jedoch noch nicht möglich.

### Präsymptomatische Diagnostik

Wenn eine konstitutionelle Mutation bei einem NF2-Patient identifiziert ist, kann eine direkte präsymptomatische Diagnostik für dessen Nachkommen

und verwandte Risikopersonen angeboten werden. Aus der Blut-DNA der zu untersuchenden Personen wird das entsprechende Exon amplifiziert und direkt sequenziert. Somit ist es möglich bei Risikopersonen Mutationsträger zu identifizieren oder auszuschließen.

Für Familien mit mehr als einem NF2-Betroffenen kann eine Kopplungsanalyse durchgeführt werden, um das defekte *nf2*-Allel von dem normalen *nf2*-Allel zu unterscheiden. Anschließend können Risikopersonen auf die Trägerschaft des defekten *nf2*-Allels untersucht werden. Dies ist sinnvoll für die Familien, bei denen keine konstitutionelle Mutation gefunden worden ist.

In den meisten Fällen ist jedoch nur ein Familienmitglied betroffen. So kann das defekte Allel nicht durch Kopplungsanalyse festgestellt werden. Bei dieser Konstellation kann die Analyse von Tumormaterial des Betroffenen sinnvoll und hilfreich sein. Beim Nachweis eines *nf2*-Allel-Verlustes in Tumoren, der in 30 bis 50% der Fälle auftritt, kann das defekte Allel festgestellt werden. Bei Risikopersonen kann so geprüft werden, ob diese das Allel geerbt haben. Der Nachweis der gleichen Mutation in mehreren Tumoren oder in einem Tumor, in dem das andere *nf2*-Allel verloren ist, würde darauf hinweisen, daß diese Mutation konstitutionell ist. So kann bei Risikopersonen direkt das Vorliegen einer Mutation geprüft werden.

Wir favorisieren für NF Betroffene eine interdisziplinäre Behandlung und Be-

treuung in Zentren, die mit dem Krankheitsbild der NF2 vertraut sind. Dies bedeutet, daß nach differenzierter klinischer Untersuchung Strategien zur Behandlung festgelegt werden sollten. Dies gilt nicht nur für Verlaufskontrollen und zukünftige operative Therapien, sondern auch für die psychosoziale Integration von Menschen, für die ein erhöhtes Risiko einer Vielzahl von Komplikationen neben der Ertaubung besteht.

### Literatur

1. Evans DGR et al. (1992) A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Q J Med* 84:603-618
2. Parry DM et al. (1994) Neurofibromatosis 2 (NF2): Clinical characteristics of 63 affected individuals and clinical evidence for heterogeneity. *Am J Med Genet* 52:450-461
3. Mautner VF et al. (1996) The neuroimaging and clinical spectrum of neurofibromatosis 2. *Neurosurgery* 38(5): 880-886
4. Mautner VF et al. (1995) Spinal tumors in patients with neurofibromatosis type 2: MR imaging study of frequency, multiplicity, and variety. *AJR* 165: 951-955
5. Gutmann et al. (1997) The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 278:51-57
6. Rouleau GA et al. (1993): Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 363:515-521
7. Trofatter JA et al. (1993): A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72:791-800
8. Parry DM et al. (1996): Germ-line mutations in the neurofibromatosis 2 gene: Correlations with disease severity and retinal abnormalities. *Am J Hum Genet.* 59:529-539
9. Kluwe Let al. (1996) Identification of NF2 germ-line mutations and comparison with neurofibromatosis 2 phenotypes. *Hum Genet* 98: 534-538
10. Kluwe L et al. (1998) Phenotypic variability associated with 14 splice-site mutations in the nf2 gene. *Am J Med Genet* 77: 228-233

### Korrespondenzadresse:

PD. Dr. Victor-F. Mautner  
 Neurofibromatose Ambulanz  
 Klinikum Nord Ochsenzoll  
 Langenhorner Chaussee 560  
 22419 Hamburg  
 Tel 040-5271-2872  
 Fax 040-5277462  
 vrges@aol.com