® Postepy Hig Med Dosw (online), 2015; 69: 1331-1348
e-ISSN 1732-2693

www.phmd.pl
Review

Received: 2015.01.22
Accepted: 2015.09.08
Published: 2015.12.09

Neurofibromina – budowa i funkcje białka w kontekście patogenezy nerwiakowłókniakowatości typu I*

Neurofibromin – protein structure and cellular functions in the context of neurofibromatosis type I pathogenesis

Anna Abramowicz, Monika Gos****

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa

Streszczenie

Nerwiakowłókniakowatość typu I jest chorobą wieloukładową charakteryzującą się pigmentowymi zmianami skórnymi, zwiększoną predyspozycją do wystąpienia rozrostów nowotworowych, zaburzeniami neurologicznymi oraz wadami układu kostno-szkieletowego. Jest to choroba monogenowa, dziedzicząca się autosomalnie dominująco, której przyczyną są mutacje w genie *NF1* kodującym neurofibrominę - wielofunkcyjne białko regulatorowe.
Podstawową funkcją neurofibrominy jest regulacja aktywności białka RAS, zaangażowanego w proces kontroli proliferacji i różnicowania komórek przez szlaki sygnałowe RAS/MAPK oraz RAS/PI3K/AKT. Neurofibromina jest ponadto regulatorem aktywności cyklazy adenylowej, a zatem szlaku sygnałowego cAMP/kinaza białkowa A zaangażowanego m.in. w kontrolę podziałów komórkowych oraz regulującego procesy uczenia się i pamięci. Oddziałuje także z wieloma innymi białkami, wpływając na transport wewnątrzkomórkowy (tubulina, kinezyna), rearanżacje cytoszkieletu aktynowego (LIMK2, Rho i Rac) czy morfogenezę i funkcjonowanie komórek nerwowych (syndekan, białka CRMP).

Ekspresja i aktywność neurofibrominy są ściśle regulowane przez ekspresję różnych izoform mRNA w zależności od typu tkanki i momentu rozwoju organizmu, lokalizacji białka w komórce czy jego modyfikacje potranslacyjne (fosforylacja, ubikwitynacja) i oddziaływanie z innymi białkami (np. białkiem 14-3-3). Udział neurofibrominy w wielu procesach komórkowych powoduje, że zaburzenia jej funkcji wynikające z małej dostępności białka lub jego zmniejszonej aktywności będą znacząco wpływać na funkcjonowanie komórek, a tym samym całego organizmu, co skutkuje rozwojem nerwiakowłókniakowatości typu I. W artykule zostały przedstawione podstawowe funkcje neurofibrominy w kontekście patogenezy molekularnej nerwiakowłókniakowatości typu I.

Słowa kluczowe: **nerwiakowłókniakowatość typu I • neurofibromina • szlak RAS/MAPK • szlak cAMP/PKA • modyfikacje potranslacyjne**

Summary

Neurofibromatosis type I (NF1) is multisystemic disease characterized by pigmentary skin changes, increased susceptibility to tumor formation, neurological deficits and skeletal defects. The disease is a monogenic, autosomal dominant disorder, caused by the presence of mutations in

*Badania dotyczące patogenezy molekularnej RASopatii możliwe są dzięki finansowaniu z Narodowego Centrum Nauki (UMO-2011/01/D/NZ5/01347 i UMO-2013/09/B/NZ2/03164).

**Autorki przyczyniły się do powstania pracy w jednakowym stopniu.

the *NF1* gene encoding neurofibromin – a multifunctional regulatory protein. The basic function of neurofibromin protein is modulation of the RAS protein activity necessary for regulation of cell proliferation and differentiation by the RAS/MAPK and RAS/PI3K/AKT signal transduction pathways. In addition, neurofibromin is a regulator of adenylate cyclase activity and therefore may interfere with signaling by the cAMP/protein kinase A pathway that regulates cell cycle progression or learning and memory formation processes. Neurofibromin also interacts with many other proteins that are engaged in intracellular transport (tubulin, kinesin), actin cytoskeleton rearrangements (LIMK2, Rho and Rac) or morphogenesis of neural cells (syndecans, CRMP proteins). The activity of neurofibromin is strictly regulated by the expression of different *NF1* mRNA isoforms depending on tissue type or period in organism development, the protein localization, posttranslational modifications (phosphorylation, ubiquitination) or interactions with other proteins (e.g. 14-3-3). The fact that neurofibromin is engaged in many cellular processes has significant consequences when the proper protein functioning is impaired due to decreased protein level or activity. It affects the normal cell function and results in disturbances of organism development that lead to the occurrence of clinical signs specific for NF1. In the article, the basic neurofibromin functions are presented in the context of the molecular pathogenesis of NF1.

Key words: **neurofibromatosis type I • neurofibromin • RAS/MAPK pathway • cAMP/PKA pathway • posttranslational modifications**

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1185213

Word count: 6856
Tables: 1
Figures: 5
References: 81

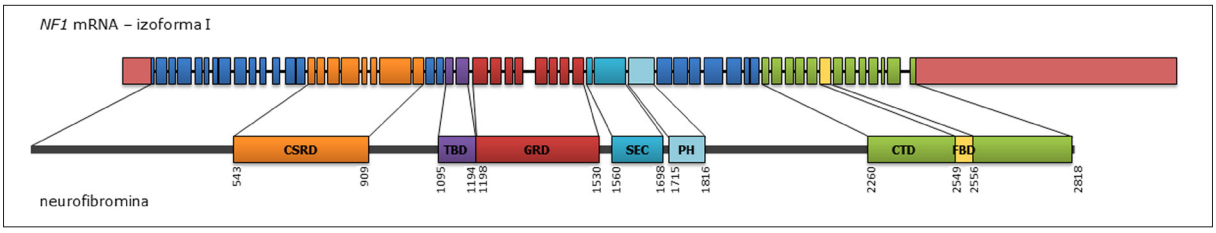
Adres autorki: dr Monika Gos, Zakład Genetyki Medycznej, Instytut Matki i Dziecka, ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa; e-mail: monika.gos@imid.med.pl

Wstęp

Nerwiakowłókniakowatość typu I (NF1, OMIM 162200) jest jedną z częściej występujących chorób genetycznych wśród dzieci (1:3500 urodzeń). Jest to choroba wieloukładowa, której objawy rozwijają się u 50% pacjentów przed ukończeniem 1 roku życia, zaś pełny obraz kliniczny u znaczącej większości pacjentów (97%) rozwija się przed ukończeniem 9 r.ż. [45,78].

Charakterystycznym objawem nerwiakowłókniakowatości typu I, a zarazem jednym z głównych kryteriów diagnostycznych jest obecność zmian barwnikowych na skórze - plam w kolorze kawy z mlekiem (tzw. plamy CAL), którym często towarzyszy piegowate nakrapianie okolic pach i pachwin [1,9,13,45,78]. Nerwiakowłókniakowatość typu I jest również chorobą predysponującą do występowania łagodnych i złośliwych nowotworów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Wrodzona predyspozycja do rozwoju nowotworów powoduje, że u około 95% pacjentów stwierdza się obecność łagodnych zmian rozrostowych - nerwiakowłókniaków. Guzy te wywodzą się z komórek osłonek nerwów i tworzą się wzdłuż lub na zakończeniach nerwów obwodowych. Ze względu na umiejscowienie guzów wyróżnia się nerwiakowłókniaki skórne (zazwyczaj liczne i bezobjawowe), podskórne (guzy twarde, dające objawy neurologiczne, zwykle nieulegające progresji do nowotworów złośliwych) oraz splotowe (obejmujące kilka wiązek nerwowych i ich połączenia) [9]. Nerwiakowłókniaki splotowe mają tendencję do wzmożonego wzrostu, co może prowadzić do znaczących deformacji ciała, kompresji nerwów i naruszenia struktur kostnych oraz związanych z tym powikłań. Skutkiem częstych podziałów komórkowych może być także transformacja nowotworowa i progresja zmiany łagodnej do nowotworu złośliwego - w tym przypadku złośliwego guza z osłonek nerwów obwodowych (Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumours, MPNST). Rokowania w przypadku tego nowotworu, stwierdzanego u około 2-3% pacjentów NF1, są niekorzystne, co częściowo może być związane z późnym jego rozpoznaniem oraz brakiem skutecznych programów leczniczych [9,45,78].

U około 15-20% pacjentów ze skórnymi zmianami wskazującymi na rozpoznanie NF1, rozwijają się nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, najczęściej glejaki nerwu wzrokowego lub gwiaździaki. Większość z tych nowotworów nie daje objawów klinicznych, zaś w przypadkach bardziej zaawansowanych obserwuje się znaczny ubytek widzenia, zmiany endokrynologiczne związane z nacie-



Ryc. 1. Schemat genu *NF1* i białka – neurofibrominy. Na rycinie zaznaczono poszczególne domeny białka oraz odpowiadające im eksony; CSRD – domena bogata w cysteinę i serynę, TBD – domena wiążąca tubulinę, GRD – domena GTPazowa, SEC-PH – domena oddziaływująca z fosfolipidami, CTD – domena C-końcowa, FBD – domena wiążąca białko FAK

kaniem podwzgórza i/lub wytrzeszcz. U pacjentów NF1 stwierdza się także częstsze zachorowania na nowotwory układu krwiotwórczego, w szczególności wczesnodziecięcą białaczkę mielomonocytową oraz zespoły mielodysplastyczne, czy występowanie guzów chromochłonnych (pheochromocytoma) [45,78]. Jednym z charakterystycznych objawów NF1 są także guzki Lischa - zmiany o typie hamartoma umiejscowione w obrębie tęczówki, zawierające m.in. komórki pigmentowe, co umożliwia ich łatwą identyfikację i powoduje, że są jednym z kryteriów klinicznych rozpoznania nerwiakowłókniakowatości typu I [9,45].

Ponadto u pacjentów NF1 obserwuje się wiele objawów niezwiązanych z tworzeniem się guzów. U około 30-60% chorych występują trudności szkolne związane z zaburzeniami widzenia przestrzennego, koordynacji wzrokowo-ruchowej oraz problemami z koncentracją, planowaniem i organizacją. U części pacjentów obserwuje się także nietypowe zmiany kostne, np. dysplazję kości klinowej, skoliozę, staw rzekomy kości piszczelowej czy makrocefalię. Mogą także występować zaburzenia w funkcjonowaniu układu krążenia wynikające z nadmiernej proliferacji komórek w wewnętrznej błonie naczyń krwionośnych, co prowadzi do ich zwężenia, a w konsekwencji nadciśnienia, udarów czy choroby wieńcowej [1,71].

W diagnostyce klinicznej nerwiakowłókniakowatości typu I szczególne znaczenie mają kryteria diagnostyczne opracowane przez amerykański Narodowy Instytut Zdrowia (National Institutes of Health, NIH), które od wielu lat są podstawą do rozpoznania choroby przez klinicystów różnych specjalizacji (tabela 1) [13,45].

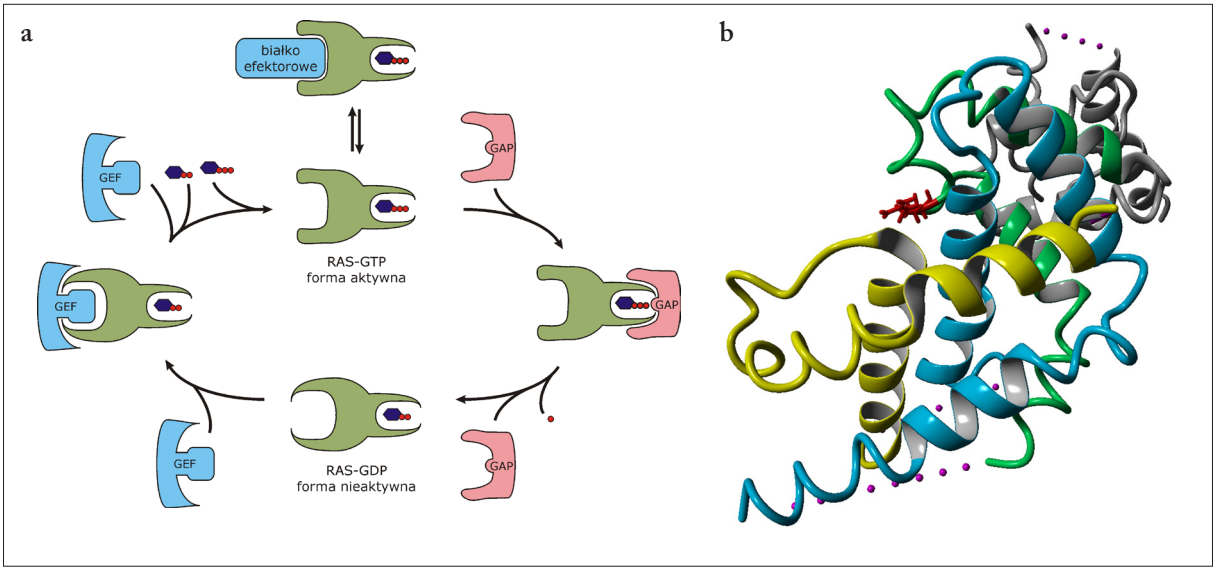
Tabela 1. Kryteria National Institutes of Health (NIH) rozpoznania nerwiakowłókniakowatości typu I (pacjent musi spełniać przynajmniej 2 z następujących objawów klinicznych)

1. Co najmniej 6 plam *cafe au lait* (CAL) o średnicy 5 mm przed okresem dojrzewania lub 15 mm po tym okresie
2. Co najmniej dwa nerwiakowłókniaki skórne lub jeden nerwiakowłókniak splotowy
3. Piegowate nakrapianie okolic pach i pachwin
4. Glejak nerwu wzrokowego
5. Co najmniej 2 guzki Lischa (hamartoma tęczówki)
6. Charakterystyczne zmiany kostne (skrzywienie kości długich, obecność stawu rzekomego, dysplazja kości klinowej)
7. U krewnego pierwszego stopnia NF1

Nerwiakowłókniakowatość typu I jest chorobą monogenową, dziedziczącą się autosomalnie dominująco. Jej przyczyną jest obecność patogennych mutacji w genie *NF1* (17q11.2, ryc. 1), które prowadzą do zahamowania syntezy lub utraty funkcji białka neurofibrominy (NF1). Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 1500 mutacji w genie *NF1* związanych z patogenezą nerwiakowłókniakowatości typu I. W większości są to mutacje prowadzące do utraty funkcji - ponad 80% opisanych mutacji germinalnych (mutacje punktowe typu nonsens, mutacje zaburzające składanie mRNA, małe delecje i insercje; rozległe delecje) w genie *NF1* powoduje powstanie skróconego, niefunkcjonalnego białka lub jego brak. Rzadziej są opisywane mutacje typu missens, które powodują zmianę struktury i/lub aktywności neurofibrominy ze względu na umiejscowienie w domenach kluczowych dla aktywności katalitycznej białka (szczegółowo omówione w [1]).

U żadnego z pacjentów do tej pory nie stwierdzono obecności mutacji w obu allelach genu *NF1*, co sugeruje, że przynajmniej jedna prawidłowa kopia genu jest niezbędna do przeżycia płodu i późniejszego funkcjonowania organizmu. Badania przeprowadzone na modelu mysim wykazały, że płody pozbawione aktywnego genu *Nf1* (*Nf1*-/-) nie są zdolne do rozwoju i obumierają pomiędzy 12,5 i 13,5 dniem rozwoju embrionalnego z powodu uogólnionej odmy i wad serca [14]. U myszy z jedną funkcjonalną kopią genu *Nf1* (*Nf1*+/-) występowało zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów, zwłaszcza guzów chromochłonnych i białaczki szpikowej, jednak nie było objawów charakterystycznych dla nerwiakowłókniakowatości typu I [43].

Białkowym produktem genu *NF1* jest neurofibromina (ryc.1). Niedobór tego białka bądź jego zmniejszona aktywność są związane ze zmianami na poziomie komórkowym, które prowadzą do wystąpienia objawów klinicznych specyficznych dla NF1. Szerokie spektrum zmian klinicznych obserwowanych u pacjentów z NF1 sugeruje, że neurofibromina jest białkiem wielofunkcyjnym zaangażowanym w regulację i działanie wielu komórkowych



Ryc. 2. Regulacja aktywności białka RAS (a) z udziałem białek pobudzających ich aktywność GTPazową (GAP, np. neurofibromina) i białek stymulujących wymianę nukleotydów guaninowych (GEF) oraz schemat budowy domeny GRD neurofibrominy; a – na granatowo zaznaczono nukleotyd guaninowy, na czerwono grupy fosforanowe; b– kolor żółty, niebieski, zielony – domeny neurofibrominy zaangażowane w oddziaływanie z białkiem RAS, na czerwono zaznaczona arginina w pozycji 1276 bezpośrednio oddziałującej z GTP. Model wykonany w programie Yasara na podstawie struktury 1NF1 z RCSB Protein Data Bank

szlaków sygnałowych [13]. W niniejszym artykule została omówiona rola neurofibrominy w komórce w kontekście jej budowy i oddziaływań wewnątrzkomórkowych. Neurofibromina jest wielofunkcyjnym białkiem biorącym udział w regulacji wielu komórkowych szlaków sygnałowych, m.in. szlaku RAS/MAPK. Reguluje także aktywność cyklazy adenylowej oraz oddziałuje z takimi białkami, jak: tubulina, kinezyna, syndekany, kinazy białkowe A i C, kaweolina czy białko prekursorowe amyloidu [51,71]. Mimo że wiele funkcji neurofibrominy nie zostało jeszcze dokładnie poznanych, poniżej zostaną przedstawione jej podstawowe funkcje regulatorowe w kontekście budowy samego białka.

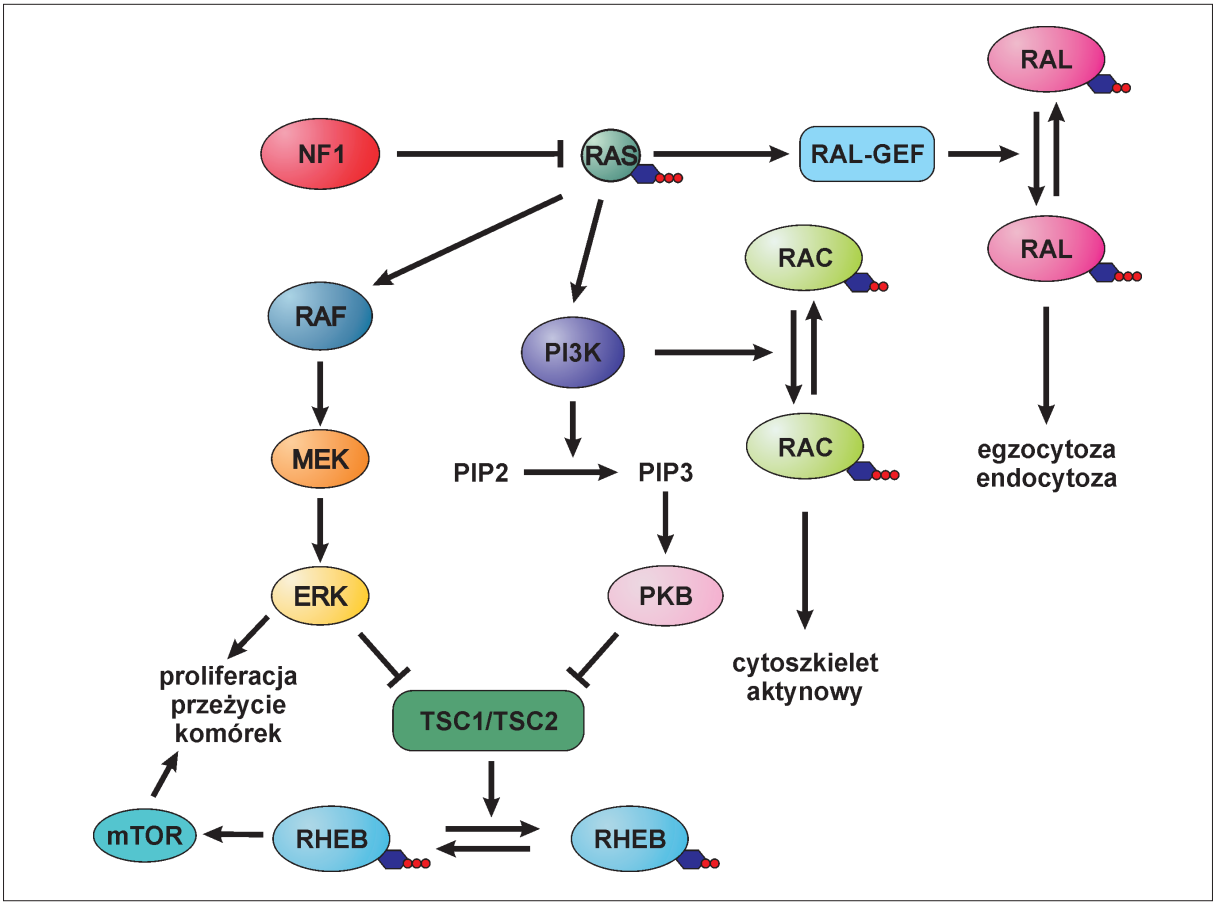
Podstawowe funkcje neurofibrominy

Regulacja aktywności białka RAS i jego szlaków efektorowych

Podstawową i najlepiej zbadaną funkcją neurofibrominy jest regulacja aktywności białka RAS, które jest jednym z głównych białek w komórce, uczestniczącym w wielu szlakach transdukcji sygnału odpowiedzialnych za regulację wielu procesów komórkowych. Białka z rodziny RAS są cząsteczkami o wielkości 21 kDa, które odgrywają ważną rolę w przekazaniu sygnału od aktywowanych receptorów czynników wzrostowych umiejscowionych w błonie komórkowej do jądra komórkowego. Pobudzenie receptorów błonowych powoduje aktywację białka RAS, co jest związane m.in. z przyłączeniem w centrum aktywnym białka - guanozyno-5'-trifosforanu (GTP). Hydroliza GTP do GDP jest związana z obniżeniem aktywności białka, a tym samym zahamowaniem szlaków sygnałowych regulowanych z udziałem białek RAS [33].

Wewnętrzna aktywność GTPazowa białek RAS jest bardzo niska, jednak szacuje się, że wzrasta ona 10^5-krotnie dzięki działaniu białek pobudzających aktywność GTPazową białek RAS (Ras GTPase-activating protein, GAP, ryc. 2a). Nieprawidłowe funkcjonowanie białek GAP bądź ich zmniejszony poziom w komórce będzie prowadzić do podwyższonej aktywności białek RAS i stymulacji szlaków transdukcji sygnału od nich zależnych. Ponieważ jednym z wielu procesów pobudzanych z udziałem szlaków zależnych od białek RAS jest progresja cyklu komórkowego, bardzo często białka GAP są określane mianem supresorów nowotworowych. Ich niedobór w komórce może prowadzić do zaburzeń podziałów komórkowych i powstania nowotworów [52].

Neurofibromina jest jednym z białek z rodziny GAP, a domeną odpowiedzialną za oddziaływania z białkiem RAS jest domena GRD (GAP related domain), która jest jednocześnie najlepiej scharakteryzowaną domeną tego białka. Domena GRD obejmuje około 330 aminokwasów (aminokwasy 1198-1530 zgodnie z NP_000258, ryc.2b) umiejscowionych w centralnej części neurofibrominy, zaś minimalna wielkość peptydu, dla którego zostaje zachowana aktywność katalityczna to 230 aminokwasów [3]. W strukturze drugorzędowej domeny GRD dominują α-helisy (16 struktur), zaś za oddziaływanie z białkiem RAS odpowiedzialne są głównie aminokwasy zlokalizowane w pozycjach: 1253-1304, 1331-1403 i 1412-1463 (ryc.1) [2]. Domena GRD białka NF1 wykazuje znaczną homologię z innymi domenami katalitycznymi białek z rodziny GAP, takimi jak ssacze białko p120GAP, białka IRA1 oraz IRA2 z *Saccharomyces cerevisiae*, białko GAP1 z *Drosophila melanogaster* oraz białkiem sar1 z *Schizosaccharomyces pombe* [7,61,79].



Ryc. 3. Szlaki sygnałowe regulowane z udziałem białka RAS; ERK - kinaza aktywowana działaniem czynników mitogennych, MEK – kinaza kinazy aktywowanej działaniem czynników mitogennych, mTOR – kinaza mTOR, tzw. ssaczy cel rapamycyny, NF1 – neurofibromina, PIP2 - 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu, PIP3 - 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu, PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, PKB – kinaza białkowa B, RAS, RAL, RAC, RHEB – białka z super rodziny RAS, małe GTPAzy, TSC1 – hamartyna, TSC2 – tuberyna

Neurofibromina wykazuje 50-100 razy większe powinowactwo do białka RAS związanego z GTP niż inne białko z rodziny GAP, P120GAP. Oddziaływania białka RAS i NF1 opierają się na utworzeniu kompleksu pomiędzy domeną GRD a rowkiem centralnej domeny katalitycznej białka RAS. Struktura ta jest stabilizowana przez oddziaływanie palca argininowego białka NF1 ze specyficznymi aminokwasami znajdującymi się w regionach przełączników I i II białka RAS [49]. Analizy strukturalne i biochemiczne wykazały, że interakcja obu białek prowadzi do hydrolizy GTP. Kluczowa dla tej reakcji jest stabilizacja aminokwasów na przełączniku I i II, zwłaszcza glutaminy w pozycji 61 białka RAS oraz stymulacja hydrolizy trójnukleotydu przez bezpośrednie oddziaływanie argininy w pozycji 1276 białka NF1 z miejscem aktywnym białka RAS. Tak zwany palec argininowy NF1 neutralizuje ładunki ujemne, które tworzą się na GTP podczas przeniesienia grupy fosforowej [68].

Jak wspomniano wcześniej, białko RAS jest jednym z głównych białek biorących udział w przekazywaniu sygnału w komórce (ryc.3). Jego nadmierna aktywacja, wynikająca z nieprawidłowego działania neurofibrominy, będzie prowadzić do zaburzeń cyklu komórkowego lub innych procesów komórkowych. Aktywne białko RAS stymuluje aktywację wielu szlaków sygnałowych, w tym kaskady kinaz efektorowych szlaku RAS/MAPK (szlak przekazywania sygnału z udziałem kaskady kinaz aktywowanych działaniem czynników mitogennych; mitogen activated protein kinases, MAPK), wśród których znajdują się: kinaza kinazy kinazy MAP (MAPKKK, MAP3K, białka z rodziny RAF), kinaza kinazy MAP (MAPKK, MAP2K, białka MEK) oraz kinaza MAP, nazywana również białkiem ERK. Aktywne białka ERK ulegają translokacji do jądra, gdzie są odpowiedzialne za aktywację odpowiednich czynników transkrypcyjnych, które pobudzają ekspresję specyficznych genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, apoptozę, różnicowanie czy migrację komórek [17,33].

Innymi białkami efektorowymi aktywnego białka RAS są kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K). Katalizują one reakcję przemiany 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2) w 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu (PIP_3), który wpływa na aktywację białka AKT/PKB poprzez jego rekrutację do błony komórkowej, gdzie może ulec fosforylacji z udziałem kinazy PDK1. Aktywne białko AKT

fosforyluje wiele białek, w tym białko TSC2 - składnik kompleksu TSC1/TSC2. Kompleks ten jest negatywnym regulatorem aktywności GTPazy Rheb, która jest niezbędna do aktywacji białka mTOR (ssaczy cel rapamycyny, mammalian target of rapamycin). Aktywacja kinazy mTOR jest związana z pobudzeniem syntezy wielu białek, które mają wpływ na wzrost komórek, ich proliferację, migrację i przeżycie [44]. Kinaza PI3K jest również pozytywnym regulatorem białka RAC - GTPazy, której aktywność jest związana z reorganizacją cytoszkieletu, adhezją komórek oraz oddziaływaniami międzykomórkowymi. GTPaza RAC1 jest także zaangażowana w różnicowanie i migrację osteoklastów, których nieprawidłowe funkcjonowanie, m.in. zwiększona aktywność lityczna prowadzi do wad układu kostno-szkieletowego obserwowanych u pacjentów NF1 [57,80].

Efektem mutacji w genach kodujących białka RAS jest stała ich aktywacja, co prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek wskutek zaburzeń działania szlaków RAS/MAPK i PI3K/AKT/mTOR i może przyczyniać się do transformacji nowotworowej lub zaburzeń rozwojowych. Podobny mechanizm będzie działał w przypadku mutacji w genie *NF1* powodujących powstanie skróconej, nieaktywnej postaci białka lub znaczne zmniejszenie jego aktywności. Utrata nawet jednej prawidłowej kopii genu *NF1* jest wystarczająca, aby komórki mogły uzyskać przewagę proliferacyjną, co oznacza, że neurofibromina działa jak klasyczny supresor nowotworowy [51]. Bardzo często o genie *NF1* wspomina się w kontekście hipotezy dwóch uderzeń Knudsona, dotyczącej przyczyn powstawania nowotworu [48]. Dowodem na prawdziwość tej hipotezy mogą być obecne w materiale pobranym z łagodnych i złośliwych guzów pacjentów NF1, dodatkowe mutacje somatyczne w genie *NF1*. Ponadto w komórkach nowotworowych pacjentów NF1 stwierdzono znaczny wzrost aktywności szlaku RAS/MAPK i mTOR [26,56,58]. Okazało się także, że linie komórkowe uzyskane z komórek nowotworów złośliwych pobranych od pacjentów NF1 są wrażliwe na działanie rapamycyny - swoistego inhibitora aktywności mTOR. Sugeruje to możliwe zastosowanie tego leku w terapii nowotworów złośliwych stwierdzanych u pacjentów z nerwiakowłókniakowatością typu I [31].

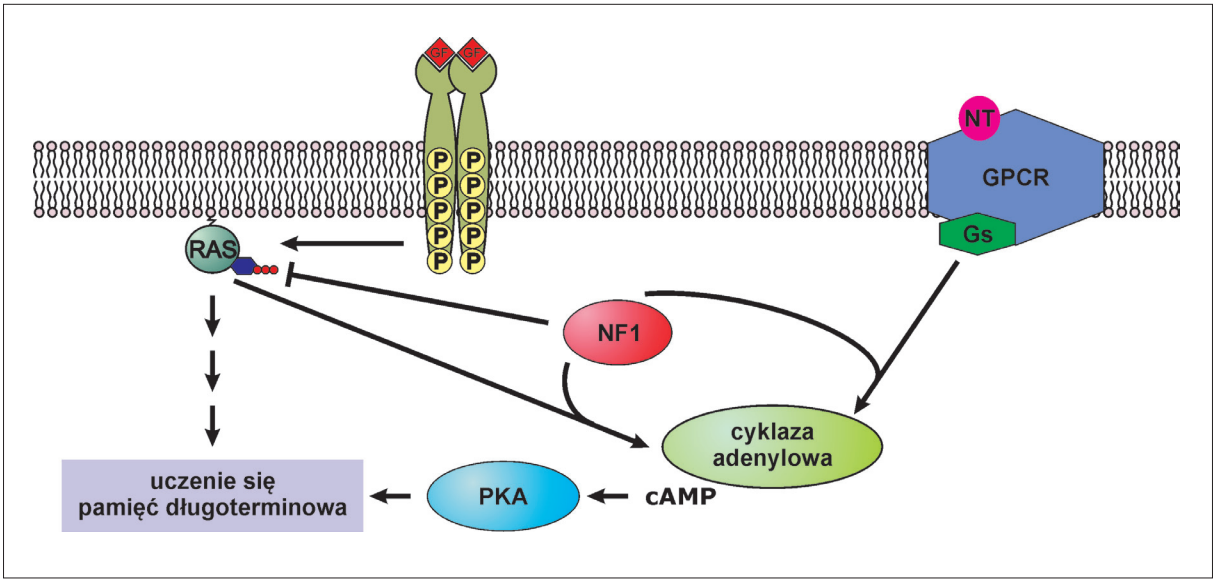
Białko RAS jest także regulatorem białek RalGEF, odpowiedzialnych za aktywację małych GTPaz - RalA i RalB. Białka te, w postaci aktywnej związanej z GTP, są odpowiedzialne za regulację wielu procesów komórkowych, takich jak: zmiany struktury cytoszkieletu, endo- i egzocytoza lub transkrypcja szeregu genów, związanych z przeżyciem i podziałem komórek [62]. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że szlak RalGEF/Ral jest szczególnie istotny dla zależnego od białka RAS procesu transformacji nowotworowej - jego aktywność była znacznie podwyższona w nowotworach związanych z mutacjami genów z rodziny RAS (np. rak jelita grubego, czerniak, rak trzustki). W kontekście NF1, stwierdzono, że w liniach komórkowych uzyskanych z typowego dla NF1 nowotworu złośliwego wywodzącego się z osłonek nerwów obwodowych (MPNST), aktywność białek z rodziny Ral była znacząco podwyższona w porównaniu do prawidłowych komórek Schwanna [23,81].

Białko RAS jest głównym regulatorem szlaków związanych z proliferacją komórek, ich różnicowaniem lub zdolnością do migracji. Wykazano także, że aktywność szlaku RAS/MAPK odgrywa znaczącą rolę w plastyczności synaptycznej, podstawowej dla rozwoju układu nerwowego. Liczne badania wykazały, że zaburzona regulacja tego szlaku prowadzi do zaburzeń przewodnictwa nerwowego, w tym długotrwałego pobudzenia synaptycznego (long term potentiation, LTP), związanego z procesami uczenia się i kształtowania pamięci. Szlak RAS/MAPK jest także zaangażowany w regulację powstawania kolców dendrytycznych, zaś jego nadmierna aktywacja wynikająca np. z niedoboru neurofibrominy będzie powodować zmniejszenie ich liczby, tym samym prowadząc do zaburzeń przekaźnictwa nerwowego [63]. Ponadto, badania przeprowadzone na modelu mysim, z delecją jednej kopii *Nf1* wykazały, że zwiększona aktywność kinaz ERK - efektorowych białek szlaku RAS/MAPK, była związana ze wzmożoną fosforylacją synapsyny I, która jest istotna dla uwalniania pęcherzyków z neurotransmiterami do przestrzeni synaptycznej. Przykładowo w obrębie hipokampu zwiększona fosforylacja ERK powoduje zwiększone wydzielanie kwasu γ-aminomasłowego (GABA) w neuronach hamujących, co może prowadzić do deficytów w procesach uczenia się i kształtowania pamięci. Wydaje się, że regulacja wydzielania neurotransmiterów z udziałem neurofibrominy jest swoista dla neuronów GABA-ergicznych, gdyż wybiórcza inaktywacja genu *Nf1* w neuronach pobudzających (glutaminergicznych) nie wpływa na ich aktywność wydzielniczą [20].

Regulacja aktywności cyklazy adenylowej i poziomu cAMP w komórce

Poza regulacją aktywności białka RAS, a tym samym jego szlaków efektorowych, neurofibromina bierze udział w kontroli innych, niezależnych od białka RAS, komórkowych szlaków sygnałowych. Jednym z nich jest szlak cykliczny AMP/kinaza białkowa A (cAMP/PKA). Szlak cAMP/PKA jest zaangażowany w wiele procesów, takich jak: kontrola masy ciała, procesy uczenia się i pamięci czy metabolizm cukrów i lipidów. Fosforylacja różnych białek z udziałem PKA prowadzi do zahamowania wzrostu komórki, indukcji apoptozy lub zatrzymania rearanżacji cytoszkieletu, co skutkuje zmniejszeniem ruchliwości i inwazyjności komórek [35,38].

Pierwsze badania potwierdzające rolę neurofibrominy w regulacji szlaku cAMP/PKA zostały przeprowadzone na modelu *Drosophila* - osobniki nieposiadające genu *Nf1* miały obniżony poziom cAMP i około 20% mniejsze rozmiary niż muszki prawidłowe. Fenotyp muszek mógł ulec zmianie wskutek nadekspresji PKA, natomiast zmiana aktywności białka RAS nie dawała podobnego efektu. Dalsze badania wykazały, że neurofibromina jest odpowiedzialna za regulację aktywności cyklazy adenylowej, która jest możliwa dwoma sposobami (ryc. 4). Pierwszy sposób, niezależny od aktywności białka RAS, dla którego kluczowy jest C-końcowy fragment neurofibrominy (aminokwasy 1748-2818), wymaga aktywacji podjednostki α białka Gs. Ten sposób



Ryc. 4. Regulacja aktywności cyklazy adenylowej i kinazy białkowej A (PKA) przez neurofibrominę w szlaku aktywowanym przez czynniki wzrostowe (GF) i zależnym od białka RAS oraz w szlaku aktywowanym przez neurohormony (NT, serotonina, histamina) oddziałujące z receptorem sprzężonym z białkami G (GPCR)

aktywacji cyklazy adenylowej jest charakterystyczny dla działania neurotransmiterów, takich jak serotonina czy histamina i może być również związany z regulacją wzrostu organizmu. Drugi mechanizm regulacji aktywności cyklazy adenylowej, zależny od białka RAS, jest związany z aktywacją receptorów błonowych przez czynniki wzrostowe, np. EGF i nie wymaga aktywacji białek G [38,40,70].

W nerwiakowłókniakowatości typu I stwierdzono, że neurofibromina odgrywa znaczącą rolę w regulacji poziomu cAMP w komórkach gleju gwiaździstego (astrocytach) i komórkach Schwanna, z których wywodzą się nowotwory obserwowane u pacjentów NF1. Badania przeprowadzone na mysich liniach komórkowych wykazały, że astrocyty z obniżoną ekspresją neurofibrominy miały dużo niższy poziom cAMP w odpowiedzi na działanie neuropeptydu PACAP, co wynikało z niższej aktywności cyklazy adenylowej. Ponadto wykazano, że podwyższony poziom cAMP w komórkach gleju gwiaździstego miał działanie antyproliferacyjne [22].

W przypadku komórek Schwanna działanie cAMP ma zupełnie inny charakter - obecność cyklicznego AMP jest niezbędna do podtrzymania proliferacji komórek w odpowiedzi na działanie czynników wzrostowych. Jak wykazały badania, podwyższony poziom cAMP oraz obecność czynników wzrostowych są kluczowe dla wzrostu ekspresji proproliferacyjnej cykliny D1 i utrzymania jej wysokiego poziomu podczas faz G1 i S cyklu komórkowego. Niedobór neurofibrominy w mysich komórkach Schwanna powoduje znaczący wzrost poziomu cAMP oraz ekspresji cykliny D1, co stymuluje podziały komórkowe i może sprzyjać procesom transformacji nowotworowej [47].

Regulacja szlaków sygnałowych z udziałem cAMP i PKA jest również istotna w rozwoju i funkcjonowaniu układu nerwowego, zwłaszcza w procesie synaptogenezy czy procesach uczenia się i kształtowania pamięci. Badania komórek nerwowych prowadzone *in vitro* wykazały, że poziom cAMP w neuronach ośrodkowego układu nerwowego z niedoborem neurofibrominy był znacząco niższy niż w tych z prawidłowym poziomem białka. Jednocześnie zmieniona była morfologia komórek - neurony miały znacznie mniejszą długość i mniejsze stożki wzrostu oraz wykazywały zwiększony poziom apoptozy. Zmiany te były odwracalne - podanie forskoliny lub rolipramu, związków podwyższających poziom cAMP w komórkach, powodowało zmianę morfologii komórek, jak również zmniejszenie poziomu ich apoptozy. Podobnych zmian nie obserwowano w przypadku komórek nerwów obwodowych, co wskazuje, że oddziaływanie Nf1 ze szlakiem sygnałowym cAMP/PKA jest swoiste dla komórek ośrodkowego układu nerwowego. Wyłączenie ekspresji jednej kopii genu *Nf1* było wystarczające dla znaczącego zmniejszenia poziomu cAMP w komórkach i zmiany ich właściwości. Jak wykazały dalsze badania, zmieniona morfologia komórek z niedoborem neurofibrominy była wynikiem zaburzeń budowy cytoszkieletu aktynowego, co z kolei było spowodowane zmniejszoną aktywnością białka Rho regulowanego z udziałem kinazy białkowej A [15,16].

Rola neurofibrominy w rearanżacji cytoszkieletu aktynowego

Badania *in vitro* prowadzone na komórkach PC12 wykazały, że stymulacja komórek czynnikiem wzrostu nerwów (nerve growth factor, NGF) powoduje ich różnicowanie i tworzenie wypustek nerwowych, co jest związane ze zmianami struk-

tury cytoszkieletu aktynowego. Jednocześnie po upływie pewnego czasu od stymulacji NGF w komórkach stwierdzono podwyższenie aktywności GTPazowej neurofibrominy, co może wskazywać na związek między tym białkiem a rearanżacją filamentów aktynowych. Dalsze badania wykazały, że neurofibromina jest zaangażowana w regulację GTPazy Rho, która stymuluje kaskadę kinaz ROCK i LIMK2 odpowiedzialnych za fosforylację kofiliny - białka zdolnego do wiązania fibrylarnej i globularnej postaci aktyny, stymulującego jej depolimeryzację. Przyłączenie reszty fosforanowej do kofiliny powoduje jej odłączenie od cząsteczek aktyny co pobudza tworzenie się filamentów aktynowych. Zahamowanie aktywności neurofibrominy lub obniżenie jej poziomu powoduje zależną od domeny GRD aktywację szlaku Rho/ROCK/LIMK2 pobudzającą ruchliwość komórek, ich inwazyjność oraz zdolność do tworzenia agregatów komórkowych. Właśnie te zmiany mogą być jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie się nerwiakowłókniaków u pacjentów NF1. Wydaje się, że szlak Rho/ROCK/LIMK/kofilina może być także zaangażowany w morfogenezę komórek nerwowych, dla której ważne są zmiany w budowie cytoszkieletu aktynowego [64].

Jak wspomniano wcześniej, neurofibromina przez oddziaływanie z białkiem RAS uczestniczy również w regulacji aktywności kinazy PI3K, która pobudza m.in. białko Rac1 zaangażowane w regulację migracji i adhezji komórkowej przez wpływ na strukturę cytoszkieletu aktynowego [80]. Białko Rac aktywuje kinazę PAK, która fosforyluje białko LIMK1 oddziałujące z kofiliną. Niezależne badania przeprowadzone na mysich fibroblastach płodowych wykazały, że regulacja aktywności białka Rac z udziałem neurofibrominy może być niezależna od szlaku RAS/PI3K. Wykazano, że fragment neurofibrominy obejmujący aminokwasy 1-1163 jest także zdolny do inaktywacji białka Rac1, indukcji zmian w strukturze cytoszkieletu aktynowego i zahamowania migracji komórek. Dokładny mechanizm tej regulacji nie został poznany, sugeruje się, że neurofibromina może hamować działanie białek katalizujących przyłączenie GTP do białka Rac, stymulować działanie białek odpowiedzialnych za hydrolizę GTP lub sama działać jako białko GAP względem białka Rac [66].

Niezależnie od regulacji białek Rho i Rac, neurofibromina może także bezpośrednio oddziaływać z białkiem LIMK2 przez domenę SEC14-PH. Bezpośrednie oddziaływanie tych dwóch białek prowadzi do zmniejszenia aktywności kinazowej białka LIMK2 względem kofiliny, czego przyczyną może być zablokowanie jego fosforylacji z udziałem kinazy ROCK. Prowadzi to do zahamowania aktywności kaskady Rho/ROCK/LIMK2/kofilina, co z kolei pobudza depolimeryzację aktyny [72].

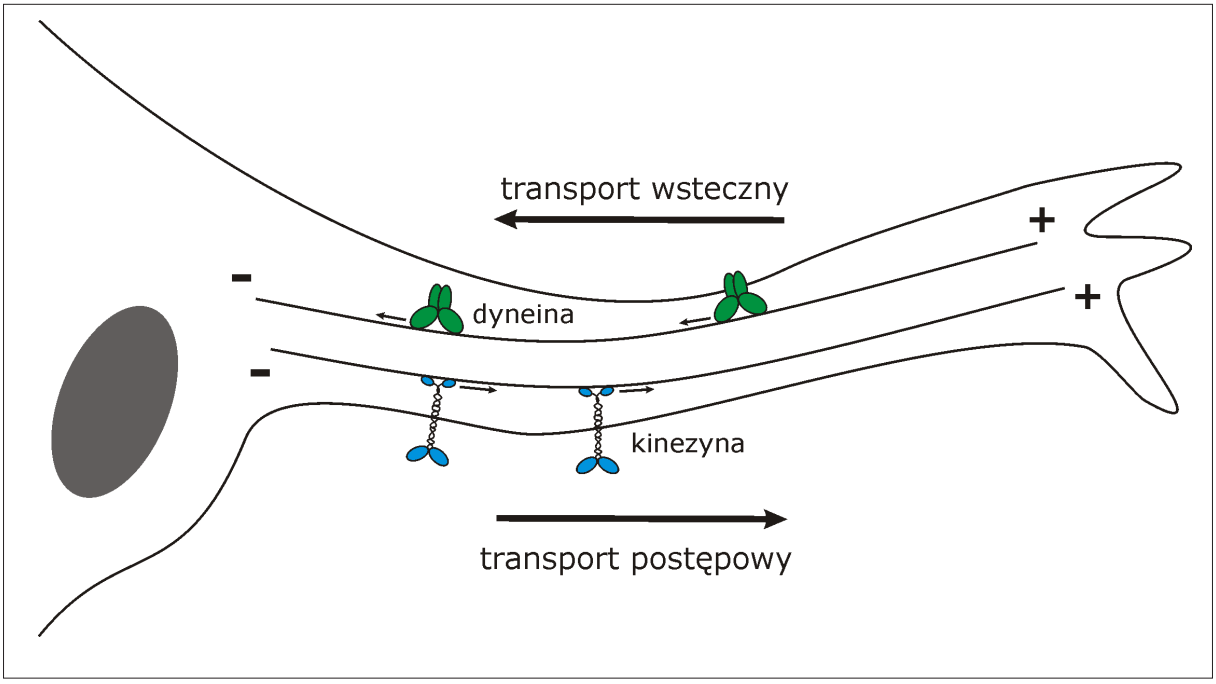
Regulacja aktywności białek CRMP

Analiza oddziaływań neurofibrominy z wykorzystaniem spektrometrii masowej wykazała, że w komórkach układu nerwowego jednym z partnerów NF1 jest białko CRMP-2 (collapsin response mediator protein). Białka z rodziny CRMP są zaangażowane swoiście w regulację rozwoju układu nerwowego, zaś białko CRMP-2 stymuluje wydłużanie aksonu przez indukcję agregacji mikrotubul w okolicach stożka wzrostu [65]. Badania przeprowadzone na modelu szczurzym wykazały, że w trakcie rozwoju embrionalnego oraz w okresie postnatalnym neurofibromina bezpośrednio oddziaływała z białkami CRMP w komórkach nerwowych, co sugeruje, że interakcja ta może odgrywać ważną rolę w kształtowaniu się układu nerwowego. Natomiast obniżenie ekspresji neurofibrominy w komórkach PC12, stosowanych jako model badawczy, spowodowało zahamowanie wzrostu aksonów, co sugeruje, że prawidłowe funkcjonowanie białka CRMP wymaga interakcji z NF1. Dalsze badania wykazały, że oddziaływanie tych dwóch białek reguluje fosforylację CRMP-2 z udziałem swoistych kinaz, np. CDK5, Rho czy GSK-3β. Fosforylacja prowadzi do odłączenia się białka CRMP od mikrotubul, co stymuluje zapadnięcie się stożka wzrostu i zahamowanie wydłużania się aksonu [65].

Neurofibromina reguluje aktywność białka CRMP również pośrednio - aktywność kinaz fosforylujących CRMP jest zależna od aktywności szlaków sygnałowych zależnych od białka RAS. Zahamowanie aktywności nuerofibrominy prowadzi do pobudzenia tych szlaków, fosforylacji CRMP i zahamowania procesu wydłużania aksonów różnicujących się komórek [55,65].

Regulacja poziomu dopaminy w układzie nerwowym

Badania z ostatnich lat wykazały, że neurofibromina może także odgrywać znaczącą rolę w regulacji homeostazy dopaminy w układzie nerwowym. Przeprowadzone na myszach *Nf1+/-* badania PET z zastosowaniem syntetycznego antagonisty receptora dopaminy D2 (raclopride) wykazały zwiększone wiązanie analogu w komórkach nerwowych prążkowia, co świadczyło o obniżonym poziomie dopaminy. Ponadto w neuronach postsynaptycznych prążkowia stwierdzono obniżoną fosforylację zależnej od dopaminy i cAMP fosfoproteiny-32 (DARPP32). Niski poziom dopaminy i związana z tym zmniejszona aktywacja receptorów dopaminergicznych były spowodowane obniżoną ekspresją transporterów dopaminy i hydroksylazy tyrozynowej. Niski poziom dopaminy stwierdzono także w komórkach hipokampu myszy, w którym prawidłowe przewodzenie nerwowe jest istotne dla procesów uczenia się i pamięci. Myszy, u których stwierdzono nieprawidłowe działanie systemu dopaminergicznego wykazywały zaburzenia funkcji poznawczych, zwłaszcza w zakresie rozwoju wizualno-przestrzennego. Zatem zaburzenia metabolizmu dopaminy mogą być potencjalną przyczyną obserwowanych u dzieci z nerwiakowłókniakowatością typu I problemów z uczeniem się czy deficytów uwagi. Potwierdza to fakt, że zastosowanie leków, które specyficznie blokują transporter dopaminy, np. metylofenidatu, znacznie poprawia funkcjonowanie chorych dzieci. Podobny efekt obserwuje się na modelach zwierzęcych - zastosowanie leków, które są analogami dopaminy, zwiększają jej wytwarzanie w komórkach nerwowych (L-DOPA) lub blokują jej wychwyt przez specyficzne transportery, powoduje poprawę zdolności poznawczych myszy z deficytem neurofibrominy [28].



Ryc. 5. Schemat szlaków transportu wewnątrzkomórkowego zależnego od mikrotubuli; transport postępowy zależny od kinezyny w kierunku wypustek komórkowych, transport wsteczny zależny od dyneiny w kierunku ciała komórki. Domena TBD neurofibrominy oddziałuje z mikrotubulami, a samo białko może tworzyć kompleksy transportowe z białkami motorycznymi (wg [17] zmodyfikowano)

Mimo że zastosowanie leków powodujących zwiększenie dostępności dopaminy w układzie nerwowym znacznie poprawia zdolności poznawcze u myszy i dzieci z niedoborem neurofibrominy, to dokładny mechanizm oddziaływań neurofibromina/dopamina nie został poznany. Wydaje się, że jednym z mechanizmów związanych z zaburzeniami aktywności neuronów dopaminergicznych hipokampu jest nieprawidłowa aktywność cyklazy adenylowej i zbyt niski poziom cAMP w komórkach nerwowych. Podanie L-DOPA myszom *Nf1+/-* spowodowało zwiększenie poziomu cAMP oraz poziomu fosforylacji DARPP32 w hipokampie. Równocześnie prowadzone badania *in vitro* wykazały, że dopamina lub agonista receptora dopaminowego D1 (SKF38393) dodane do hodowli neuronów hipokampu myszy *Nf1+/-* powodowały przywrócenie prawidłowej morfologii komórek, tzn. zwiększenie długości aksonów i obecność stożków wzrostu o prawidłowych rozmiarach [29].

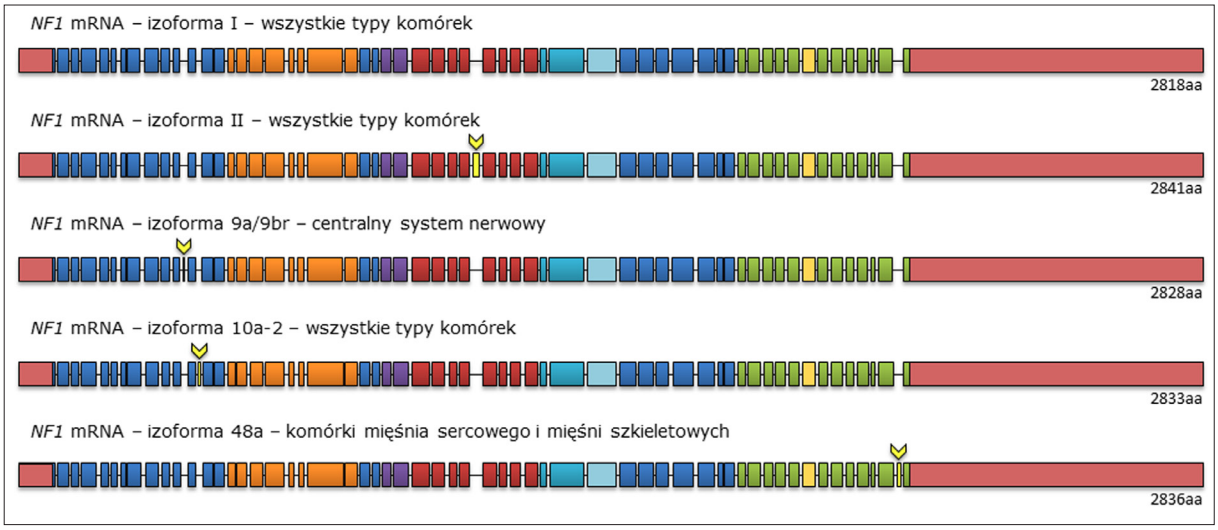
Regulacja aktywności białek sygnałowych poprzez oddziaływanie z kaweoliną-1

Jednym z białek oddziałujących z neurofibrominą jest kaweolina-1 - białko błonowe, będące składnikiem kaweoli - specyficznych struktur w obrębie błony komórkowej biorących udział w przekazywaniu sygnału w komórce oraz endocytozie. W białku NF1, w pobliżu domen GRD i Sec14-PH zidentyfikowano 4 miejsca potencjalnie wiążące kaweolinę-1 (caveolin binding domains, CBDs) obejmujące aminokwasy: 1606-1613, 1658-1666, 1678-1685 i 2102-2109. Domeny te uczestniczą w tworzeniu specyficznego kompleksu, który, jak wykazały badania *in vitro* prowadzone na mysich fibroblastach płodowych, jest odpowiedzialny za regulację aktywności, m.in. białek RAS oraz kinaz białkowych - FAK i AKT [12].

Neurofibromina, poza regulacją aktywności białka FAK z udziałem kaweoliny-1, również oddziałuje z nim bezpośrednio poprzez motyw TPPKM i domenę obejmującą aminokwasy 2549-2556, umiejscowione w C-końcowej części neurofibrominy. Białko FAK jest niereceptorową kinazą tyrozynową, która jest krytycznym regulatorem wielu procesów komórkowych, takich jak: adhezja, proliferacja czy przeżycie komórek. Badania *in vitro* wykazały, że komórki pozbawione białka NF1 wykazywały zwiększoną adhezję do podłoża, a także zmiany w organizacji cytoszkieletu aktynowego oraz lokalizacji samego białka FAK, co sugeruje jej udział w regulacji adhezji i wzrostu komórek. Ponadto domena oddziałująca z białkiem FAK pokrywa się z sekwencją lokalizacji jądrowej NF1 (aminokwasy 2534-2550), co sugeruje potencjalny wpływ oddziaływań tych dwóch białek na lokalizację komórkową neurofibrominy [50].

Oddziaływanie neurofibrominy z mikrotubulami i transport wewnątrzkomórkowy

Badania *in vitro* prowadzone na komórkach mysiego gleju gwiaździstego wykazały, że niedobór neurofibrominy jest związany ze zwiększoną proliferacją komórek zależną



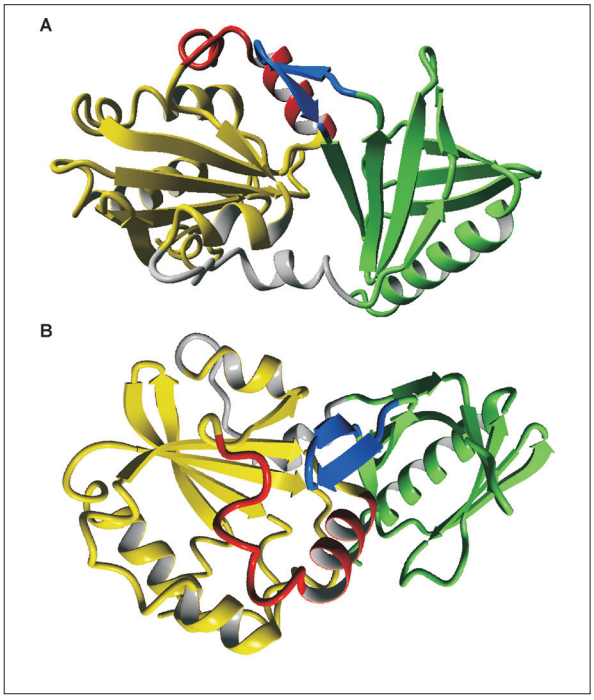
Ryc. 6. Izoformy mRNA dla genu *NF1* wraz z miejscem ekspresji

od białek RAS i PKA. Jednak dodatkowo zaobserwowano, że astrocyty *Nf1+/-* wykazywały zmniejszoną adhezję do podłoża hodowlanego. Dalsze badania wykazały, że obniżona ekspresja neurofibrominy była związana z większą ruchliwością komórek oraz zmianami w strukturze cytoszkieletu aktynowego [37]. Obserwacje te sugerowały istnienie oddziaływań pomiędzy neurofibrominą a białkami cytoszkieletu, niezależnych od aktywności białka RAS. Było to również potwierdzenie wyników badań prowadzonych już w latach 90. XX w., które wskazywały na oddziaływania neurofibrominy z mikrotubulami [10,34]. Domeną odpowiedzialną za te oddziaływania jest domena wiążąca tubulinę (tubulin binding domain, TBD), umiejscowiona w pobliżu domeny GRD. Stwierdzono, że obecność tubuliny powoduje obniżenie aktywności GTPazowej neurofibrominy, a badania *in vitro* wykazały, że zahamowanie aktywności jest znacznie silniejsze, jeśli badane jest białko o pełnej długości niż fragment zawierający tylko domeny TBD i GRD (NF1-GRD). Wskazuje to na istnienie dodatkowych miejsc, potencjalnie oddziałujących z tubuliną, których odwracalne modyfikacje mogą wpływać na siłę tych oddziaływań [10].

Podstawowa domena odpowiedzialna za interakcję neurofibrominy z tubuliną jest umiejscowiona w N-końcowej części regionu oddziałującego z białkiem RAS i obejmuje aminokwasy 1095-1194 (kodowane przez eksony 25-27). Badania z wykorzystaniem spektrometrii masowej, potwierdzone później badaniami *in vitro*, wykazały, że poza mikrotubulami domena TBD oddziałuje także z łańcuchem ciężkim dyneiny i kinezyną-1 - białkami motorycznymi odpowiedzialnymi za transport organelli lub dużych kompleksów wzdłuż włókien cytoszkieletu. Neurofibromina w tych oddziaływaniach prawdopodobnie pełni rolę białka adaptorowego między określonym ładunkiem a białkami motorycznymi odpowiedzialnymi za zależny od ATP transport postępowy (od jądra komórkowego do wypustek komórkowych, kinezyny) i wsteczny (do ciała komórki, dyneiny) (ryc. 5) [18]. Oddziaływanie neurofibrominy z białkami motorycznymi będzie zatem szczególnie istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórek posiadających długie wypustki cytoplazmatyczne, takich jak melanocyty czy komórki Schwanna.

Badania prowadzone *in vitro* wykazały, że w melanocytach, neurofibromina uczestniczy między innymi w transporcie melanosomów wzdłuż włókien tubulinowych. W oddziaływaniach tych uczestniczy także białko prekursorowe amyloidu, które może być elementem kompleksu tworzonego przez melanosomy i neurofibrominę z kinezyną. Niedobór neurofibrominy lub zmiany jej oddziaływań z białkami motorycznymi - kinezyną czy dyneiną - skutkują zaburzeniami formowania kompleksu transportującego melanosomy i prowadzą do nieprawidłowego gromadzenia się tych organelli w wypustkach melanocytów. Biorąc pod uwagę, że pigmentacja skóry jest zależna od gęstości melanosomów w obszarze dystalnym tych komórek, to zwiększenie gęstości melanosomów w wypustkach dendrytycznych obserwowane w komórkach z obniżonym poziomem neurofibrominy może być odpowiedzialne za zmiany pigmentacyjne (plamy CAL, piegowate nakrapianie okolic pach i pachwin) obserwowane u pacjentów NF1 [4,6,30]. Jednocześnie badania *in vitro* wykazały, że ekspresja genów kodujących markery charakterystyczne dla melanocytów jest regulowana przez szlak transdukcji sygnału RAS/MAPK. Utrata jednej kopii genu *NF1*, prowadząca do zwiększenia aktywności białka RAS, jest związana z podwyższeniem poziomu transkrypcji genów specyficznych dla melanocytów, co dodatkowo może wpływać na zaburzenia rozkładu pigmentu w skórze [27].

Również w komórkach Schwanna neurofibromina jest zaangażowana w transport wewnątrzkomórkowy. Jak wykazały badania *in vitro* jej specyficznym partnerem w tej funkcji jest białko LRPPRC (Leucine-rich PPR motif-containing protein), którego dokładna funkcja nie została jeszcze opisana, ale wiadomo, że odgrywa ważną rolę w procesach transkrypcji i transportu RNA oraz procesów endo- i egzocytozy. W ko-



Ryc. 7. Schemat budowy domeny SEC14-PH neurofibrominy (kolor żółty – domena SEC14, na czerwono zaznaczono aminokwasy 1663-1682 regulujące dostępność miejsca wiążącego ligand, kolor zielony – domena PH, na niebiesko zaznaczono fragment domeny oddziałujący z SEC14. Model wykonany w programie Yasara na podstawie struktury 2D4Q

mórkach Schwanna kompleks NF1-LRPPRC oddziałuje z kinezyną oraz włóknami mikrotubulinowymi, co sugeruje, że jest zaangażowany w transport postępowy. Dokładniejsze badania wykazały, że ten specyficzny kompleks jest odpowiedzialny za wewnątrzkomórkowy transport mRNA, ponieważ stwierdzono jego kolokalizację z granulami RNA, kompleksami rybonukleoproteinowymi, zawierającymi m.in. mRNA dla białka MBP (myelin basic protein). Niedobór neurofibrominy w komórkach Schwanna może zatem prowadzić do niedoborów mRNA *MBP* w przestrzeniach odległych od jądra komórkowego, tym samym prowadząc do nieprawidłowej syntezy mieliny - podstawowego białka będącego składnikiem otoczek włókien komórek nerwowych. Zaburzenia budowy otoczki mielinowej mogą w konsekwencji prowadzić do nieprawidłowego przewodzenia impulsów nerwowych. Potwierdziły to badania na modelu mysim z selektywnie wyłączoną ekspresją neurofibrominy w komórkach Schwanna (Nf1fl/fl; Lrpprc+/fl; P0-Cre+), u których stwierdzono demielinizację nerwów obwodowych oraz specyficzne zaburzenia motoryczne [4,5].

Regulacja aktywności neurofibrominy

Aktywność neurofibrominy podlega regulacji na wiele sposobów, zależy m.in. od ekspresji określonych izoform mRNA i białka w zależności od rodzaju tkanki, od lokalizacji białka w komórce czy specyficznych modyfikacji potranslacyjnych (np. fosforylacji), które mogą modulować jej oddziaływanie z innymi białkami.

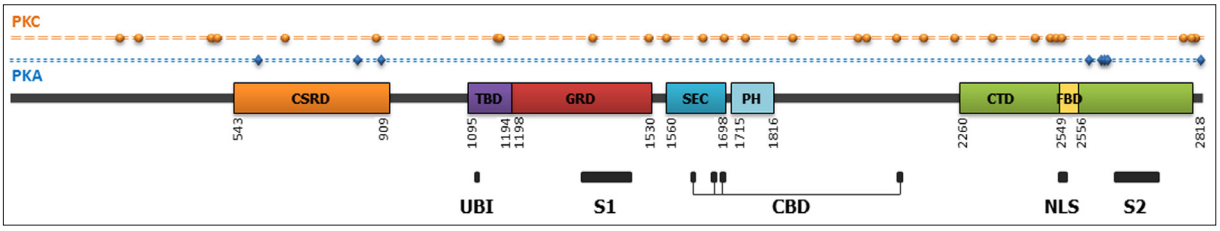
Ekspresja neurofibrominy oraz jej izoform

Ekspresja neurofibrominy różni się w zależności od rodzaju tkanki oraz etapu rozwoju organizmu. Jak wykazały badania prowadzone na modelu szczurzym na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego ekspresja neurofibrominy jest stosunkowo niska i jednakowa we wszystkich typach komórek. Dopiero około 11 dnia rozwoju zarodka w pewnych typach tkanek jej poziom gwałtownie wzrasta, zaś maksymalny poziom ekspresji neurofibrominy przypada na 16 dzień od momentu zapłodnienia [24].

Zarówno w okresie płodowym, jak i u dorosłych osobników poziom neurofibrominy jest najwyższy w komórkach układu nerwowego, co świadczy o szczególnej roli NF1 w rozwoju i funkcjonowaniu tego układu. Jednak nawet w obrębie układu nerwowego obserwuje się znaczące zmiany w poziomie ekspresji neurofibrominy. We wczesnym etapie rozwoju zarodkowego, około 12 dnia, kiedy komórki nerwowe nie zaczęły się jeszcze różnicować, poziom białka jest równomierny we wszystkich komórkach. Około 16 dnia rozwoju zarodkowego, kiedy następuje specjalizacja komórek, ekspresja neurofibrominy w obrębie układu nerwowego zaczyna się zmieniać. W dzielących się komórkach opuszki węchowej czy wewnętrznej warstwy przykomorowej kory mózgowej poziom białka znacząco spada, a w zróżnicowanych, nieproliferujących neuronach warstwy korowej czy węchomózgowia pozostaje na wysokim poziomie. Również w komórkach tworzących włókna nerwowe (fiber tracts) w obrębie śródmózgowia, tyłomózgowia i rdzenia kręgowego poziom ekspresji neurofibrominy pozostaje wysoki. Ponadto w przypadku komórek z wysoką ekspresją neurofibrominy różni się jej lokalizacja komórkowa - w obrębie włókien nerwowych białko jest obecne w aksonach, zaś w zróżnicowanych neuronach warstwy korowej w przestrzeni okołojądrowej [67].

Ekspresja neurofibrominy w komórkach nienerwowych w trakcie rozwoju embrionalnego i w okresie postnatalnym jest znacząco niższa. Po 11 dniu rozwoju zarodkowego poziom neurofibrominy wzrasta w komórkach płuca (zwłaszcza w komórkach nabłonkowych oskrzelików), serca, mięśni szkieletowych, tkanki chrzęstnej, skóry, nerek i nadnerczy oraz w leukocytach. W okresie postnatalnym ekspresja białka w niektórych z tych tkanek znacząco spada (skóra, płuco) lub zanika (tkanka chrzęstna, mięśnie szkieletowe). Zachowana zostaje ekspresja neurofibrominy w komórkach chromochłonnych rdzenia nadnerczy, dla których prawidłowego funkcjonowania wydaje się ona niezbędna - obniżenie ekspresji NF1 w komórkach nadnercza może być związane z rozwojem guzów chromochłonnych [74].

Gen *NF1* jest jednym z większych genów w ludzkim genomie, a jego ekspresja jest obserwowana we wszystkich tkankach dorosłego organizmu. Najwyższy poziom transkryptu dla *NF1* stwierdza się w neuronach, komórkach Schwanna, komórkach glejowych, komórkach chromochłonnych nadnerczy, leukocytach, jądrach i jajnikach [25,36]. Gen *NF1* składa się z 57 eksonów podstawowych



Ryc. 8. Schemat budowy neurofibrominy wraz z zaznaczonymi miejscami fosforylacji dla kinaz białkowych A i C, miejscem ubikwitynacji (UBI), miejscem wiązania syndekanów (S1 i S2), kaweoliny (CBD) oraz sygnałem lokalizacji jądrowej

oraz 4 dodatkowych (9a/9br, 10a-2, 23a i 48a), które są wykorzystywane w alternatywnym składaniu mRNA. Do tej pory zidentyfikowano 5 podstawowych izoform mRNA dla neurofibrominy, które charakteryzują się różnym profilem ekspresji w zależności od rodzaju tkanki (ryc.6).

Podstawowy transkrypt (ryc. 6), o najwyższej ekspresji we wszystkich typach komórek, koduje białko o wielkości ok. 280 kDa składające się z 2818 aminokwasów, które nie zawiera aminokwasów kodowanych przez eksony dodatkowe. Najczęściej opisywaną izoformą mRNA jest transkrypt *NF1* zawierający ekson 23a, który koduje białko dłuższe o 23 aminokwasy od postaci podstawowej, określane jako neurofibromina typu II. Ekspresja tej izoformy jest obserwowana we wszystkich typach komórek - najwyższy poziom w stosunku do ekspresji izoformy I obserwuje się w komórkach glejowych (75,5%), natomiast w neuronach poziom tego transkryptu jest najniższy (3,8%). Wysoki poziom ekspresji dla transkryptu II jest również charakterystyczny dla nadnerczy i jajników (odpowiednio: 79,3 i 74,6%). Ponieważ dodatkowe aminokwasy są umiejscowione w obrębie domeny GRD odpowiedzialnej za podstawową aktywność białka, sugeruje się, że alternatywne składanie mRNA z wykorzystaniem eksonu 23a i wyższa ekspresja jednego z transkryptów może stanowić mechanizm regulacji aktywności neurofibrominy [39].

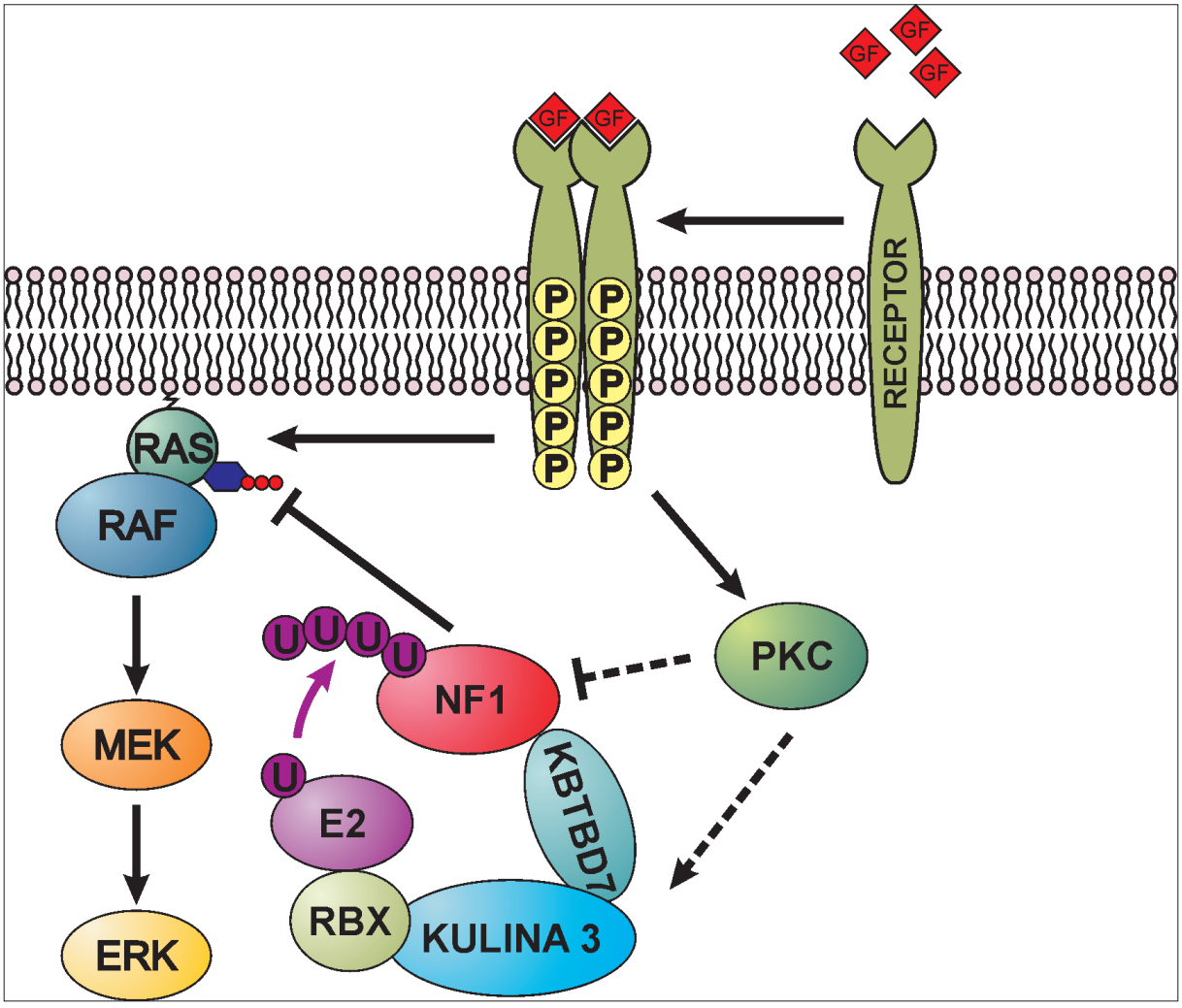
Kolejną izoformą jest transkrypt *NF1* zawierający ekson 9a/9br, który koduje białko zawierające 10 dodatkowych aminokwasów, zaś jego ekspresja wydaje się ograniczona do komórek centralnego systemu nerwowego [8]. Natomiast izoforma mRNA z dodatkowym eksonem 10a-2 koduje białko dłuższe o 15 aminokwasów wchodzących w skład domeny śródbłonowej. Wariant ten ulega ekspresji na bardzo niskim poziomie we wszystkich typach komórek, jednak jego najwyższy poziom stwierdza się w komórkach centralnego układu nerwowego, komórkach gruczołowych sutka, jądra, gruczołu ślinowego i węzłów chłonnych. Białko powstałe z transkryptu zawierającego ekson 10a-2 (NF1-10a-2) znajduje się w obrębie ziarnistego retikulum endoplazmatycznego, w okolicach jądra komórkowego. Wydaje się, że ekspresja tego transkryptu jest jednym z mechanizmów regulacji lokalizacji komórkowej neurofibrominy [46]. Włączenie do transkryptu eksonu 48a powoduje powstanie białka dłuższego o 18 aminokwasów, którego ekspresja jest najwyższa w komórkach mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych. Chociaż funkcja tego transkryptu nie została jeszcze dokładnie zbadana, to sugeruje się, że może uczestniczyć w rozwoju i różnicowaniu komórek mięśniowych [71].

Lokalizacja komórkowa neurofibrominy - domeny oddziałujące z elementami błony komórkowej

Jedną z lepiej poznanych domen neurofibrominy jest dwuczęściowa domena SEC14-PH (ryc.7) odpowiedzialna głównie za wiązanie fosfolipidów znajdujących się w błonie komórkowej. Jest umiejscowiona w C-końcowej części białka, dystalnie w stosunku do domeny GRD i składa się z 2 części: segmentu SEC14 (aminokwasy 1560-1698) homologicznego do domeny Sec14p białka z *Saccharomyces cerevisiae* odpowiedzialnego za transport fosfatydyloinozytolu (PITP) oraz segmentu PH (aminokwasy 1715-1816, pleckstrin homology like domain), charakterystycznego także dla białek oddziałujących z kwasami tłuszczowymi [21,76]. Neurofibromina jest jedynym białkiem, w którym domena SEC14 jest umiejscowiona w bezpośrednim sąsiedztwie domeny PH, co sugeruje, że nie działają one jako niezależne podjednostki białka, lecz razem uczestniczą w oddziaływaniach wewnątrzkomórkowych [21,76].

Segment NF1-SEC14 (ryc. 7) swoją strukturą bardzo przypomina domeny Sec14 innych białek oddziałujących z lipidami, takich jak np. białko PITP (phosphatidylinositol transfer protein) z *S. cerevisiae*, białko transportujące α-tokoferol (αTTP), białka regulatorowe z rodzin GAP i GEF (np. RhoGEF, RhoGAP, RasGAP) czy fosfatazy tyrozynowe. Domena SEC14 neurofibrominy ma charakterystyczną budowę - w jej centralnej części znajduje się wgłębienie utworzone z β-kartek, zamknięte α-helisą (aminokwasy 1663-1682), która prawdopodobnie reguluje dostępność miejsca wiążącego ligand [21]. Domena PH neurofibrominy jest zbudowana z rdzenia złożonego z siedmiu β-kartek tworzących tunel zamknięty z jednej strony przez C-końcową α-helisę. Pomiędzy 3 i 4 β-kartką domeny PH łańcuch aminokwasowy tworzy dużą pętlę, w obrębie której znajdują się 2 β-kartki. Pętla ta bezpośrednio oddziałuje z 5 α-helisą domeny SEC14 i może pełnić rolę „wieczka" regulującego dostępność domeny SEC14 dla oddziaływań z fosfolipidami [53] (ryc 1).

Domena NF1-SEC14-PH może wiązać glicerofosfolipidy będące podstawowym składnikiem błon komórkowych i wykazuje zwiększone powinowactwo do fosfatydyloetanoloaminy, fosfatydyloglicerolu i fosfatydylocholiny. Wymienione fosfolipidy swoiście oddziałują z hydrofobową kieszenią w obrębie segmentu SEC14, zaś ta specyficzna



Ryc. 9. Mechanizm ubikwitynacji neurofibrominy po pobudzeniu receptorów czynników wzrostowych; ERK - kinaza aktywowana działaniem czynników mitogennych, MEK – kinaza kinazy aktywowanej działaniem czynników mitogennych, NF1 – neurofibromina, PKC – kinaza białkowa C

interakcja jest regulowana przez zmiany konformacyjne białka. Jednym ze związków, które regulują zmiany struktury przestrzennej jest fosfatydyloinozytol, oddziałujący z powierzchnią domeny. Charakter oddziaływań domeny SEC14-PH z glicerolofosfolipidami ma znaczenie dla błonowego umiejscowienia neurofibrominy. Jest ono kluczowe dla możliwości oddziaływania NF1 z białkiem RAS, które w aktywnej postaci jest związane z błoną komórkową [75].

O znaczeniu domeny NF1-SEC14-PH dla prawidłowej aktywności neurofibrominy świadczy to, że część mutacji typu missens identyfikowanych u pacjentów NF1 jest umiejscowiona w opisywanym regionie. Badania funkcjonalne wybranych mutacji: p.Lys1750del, p.Ile1584Val i duplikacji tandemowej w eksonie 36 wykazały, że powodowały one zaburzenia oddziaływania neurofibrominy z lipidami, mimo braku wpływu na poziom białka w komórce [77].

Poza domeną NF1-SEC14-PH, neurofibromina zabiera dwa regiony (S1 - 1356-1469 i S2 - 2619-2719) swoiście wiążące się z syndekanami - białkami śródbłonowymi, głównymi proteoglikanami heparanosiarczanowymi znajdującymi się na powierzchni komórek. Syndekany mogą być koreceptorami oddziałującymi z receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej podczas ich pobudzenia przez specyficzne czynniki wzrostowe. Jednocześnie ich pozakomórkowe domeny mogą wiązać się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i regulować adhezję komórek do podłoża i ich zdolność do migracji [42].

Sugeruje się, że oddziaływanie neurofibrominy z syndekanami jest związane z umiejscowieniem NF1 w obrębie swoistych struktur błonowych zawierających specyficzne białka np. CASK. Tego typu oddziaływań może wymagać regulacja aktywności związanego z błonami białka RAS w różnych typach komórek. Przykładowo wykazano, że w komórkach nerwowych neurofibromina oddziałuje swoiście z syndekanem-2 zaangażowanym w proces rozwoju wypustek dendrytycznych, a jej GTPazowa aktywność jest niezbędna do prawidłowego przekazywania sygnału z udziałem białek RAS. Stwierdzono,

że nadmierna aktywacja szlaku RAS/MAPK w komórkach nerwowych wywołana niedoborem neurofibrominy powoduje zmiany plastyczności komórek nerwowych [42,63]. Ponadto oddziaływanie syndekanu-2 z neurofibrominą pobudza aktywność kinazy białkowej A, która jest odpowiedzialna za fosforylację białek Ena/VASP zaangażowanych w tworzenie włókien aktynowych, a tym samym filopodii i wypustek dendrytycznych. Można zatem przypuszczać, że oddziaływanie syndekanu-2 z neurofibrominą i aktywacja obu szlaków RAS/MAPK i PKA/Ena/VASP jest niezbędna do prawidłowego różnicowania komórek nerwowych [56].

Sygnał lokalizacji jądrowej a rozmieszenie neurofibrominy w komórce

Badania ekspresji różnych izoform neurofibrominy w modelach komórkowych *in vitro* wykazały, że zmutowana postać neurofibrominy, nieposiadająca aminokwasów kodowanych przez ekson 51 (dawniej 43, NF1-ΔE43) nie ulega translokacji do jądra komórkowego. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała, że w części białka kodowanej przez ekson 51 znajduje się sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) obejmujący aminokwasy 2534-2550 (ryc.8) [73]. Mimo ewidentnego dowodu na możliwość translokacji neurofibrominy do jądra komórkowego, do tej pory nie udało się ustalić jaka może być jej rola w tej strukturze komórkowej. Sugeruje się, że neurofibromina może pełnić funkcje strukturalne, zaś sama translokacja do jądra komórkowego może być elementem regulacji aktywności białka w obrębie cytoplazmy i błon komórkowych. Niedawne badania wykazały także, że komórkowe umiejscowienie neurofibrominy może zależeć od jej fosforylacji z udziałem kinazy białkowej C (PKC) [59].

Modyfikacje potranslacyjne jako element regulacji aktywności neurofibrominy

Ważne dla aktywności neurofibrominy są również modyfikacje potranslacyjne, które m.in. regulują oddziaływanie neurofibrominy z innymi białkami (ryc.8). Domenami związanymi z regulacją NF1 przez modyfikacje potranslacyjne, głównie fosforylację, są: domena CSRD (cysteine/serine-rich domain, aminokwasy 543-909, eksony 15-22) oraz domena C-końcowa (C-terminal domain, aminokwasy 2260-2818) [11].

Fosforylacja neurofibrominy zachodzi głównie z udziałem kinazy białkowej A (PKA), zaś potencjalne miejsca fosforylacji są umiejscowione w obrębie domeny CSRD (Ser818, Thr586, Ser876) i CTD (Ser 2576, 2578, 2580, 2813 i Thr 2556). Fosforylacja tych reszt aminokwasowych jest istotnym elementem w interakcjach między neurofibrominą a innymi białkami, m.in. białkiem 14-3-3 czy DDAH (N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase) [61,69].

Białko 14-3-3 jest jednym z regulatorów aktywności białek szlaku RAS/MAPK. Oddziałuje między innymi z kinazą RAF, blokując jej aktywność fosforylacyjną, która może zostać odblokowana przez aktywację białka RAS. W przypadku neurofibrominy związanie białka 14-3-3 hamuje aktywność katalityczną GTPazy, jednak jego bezpośrednie oddziaływanie z NF1 wymaga fosforylacji białka w domenie CTD przez PKA [32].

Natomiast białko DDAH odpowiedzialne jest za stymulację fosforylacji neurofibrominy z udziałem PKA w obrębie domeny CSRD i CTD. Wydaje się jednak, że znaczenie regulacyjne ma fosforylacja i oddziaływanie NF1-DDAH w obrębie domeny CSRD, a zwłaszcza aminokwasów 815-834. Sekwencja aminokwasowa tego regionu przypomina sekwencję białek MAP2 i tau oddziałujących z mikrotubulami. Zaproponowano zatem, że fosforylacja NF1 w tym regionie może być odpowiedzialna za regulację oddziaływań neurofibrominy z mikrotubulami [69].

W obrębie domen CSRD i CTD znajdują się również miejsca fosforylacji dla kinazy białkowej C (PKC). Fosforylacja miejsc w domenie CSRD jest niezbędna m.in. do wiązania neurofibrominy z cytoszkieletem aktynowym, zwłaszcza z F-aktyną, która jest jednym z podstawowych białek wchodzących w skład filopodiów, uczestniczącym w procesach komórkowych, takich jak migracja, podziały komórkowe czy adhezja. Związanie neurofibrominy do cytoszkieletu aktynowego powoduje wzrost jej aktywności GTPazowej i zahamowanie aktywności szlaku RAS/MAPK. Badania *in vitro* prowadzone na liniach komórkowych wyprowadzonych z komórek układu nerwowego (neuronów i astrocytów) wykazały, że sygnałem indukującym fosforylację neurofibrominy w obrębie domeny CSRD i wiązanie z filamentami aktynowymi jest aktywacja receptora dla EGF, co z kolei stymuluje pobudzenie szeregu białek, w tym PKC, RAS i PLC-γ. Szczególnie istotna wydaje się aktywacja kinazy białkowej C w odpowiedzi na działanie plejotropowych czynników wzrostu, która powoduje zahamowanie progresji cyklu komórkowego (aktywacja aktywności GTPazowej NF1 i hamowanie białka RAS) i jednoczesną stymulację procesów związanych z rearanżacją cytoszkieletu komórki (migracja i różnicowanie komórek) [59].

Z kolei fosforylacja domeny CTD z udziałem kinazy białkowej C jest związana z lokalizacją komórkową neurofibrominy. Stwierdzono, że NF1 umiejscowiona w jądrze komórkowym nie jest ufosforylowana w pozycji Ser2808, która ulega modyfikacji po aktywacji kinazy białkowej C, zwłaszcza PKC α i β. Fosforylacja Ser2808 jest związana z translokacją neurofibrominy z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie może oddziaływać z innymi białkami cytoplazmatycznymi, białkami cytoszkieletu czy aktywnym białkiem RAS [54].

Ubikwitynacja jako mechanizm regulacji aktywności neurofibrominy

Ubikwitynacja białek jest modyfikacją potranslacyjną, która stanowi sygnał do degradacji zmodyfikowanych cząsteczek w proteosomach. Przyłączenie reszt ubikwitynowych do neurofibrominy jest wynikiem aktywacji receptorów błonowych o aktywności kinazy

tyrozynowej lub receptorów sprzężonych z białkami G wskutek działania egzogennych czynników wzrostowych. Degradacja neurofibrominy będzie sprzyjać pobudzaniu szlaku RAS/MAPK, a tym samym progresji cyklu komórkowego.

Sekwencje, do których są przyłączane reszty ubikwitynowe znajdują się w pobliżu domeny GRD neurofibrominy (aminokwasy 1095-1100). Po stymulacji komórek w warunkach *in vitro* surowicą lub wybranymi czynnikami wzrostowymi dochodzi do szybkiej (5 minut) degradacji neurofibrominy i pobudzenia hamowanych przez nią szlaków sygnałowych. Jednocześnie w komórkach stosunkowo szybko (30 minut) dochodzi do odtworzenia wyjściowego poziomu białka i powrotu do wyjściowego poziomu regulacji komórkowych szlaków sygnałowych, co zapobiega niekontrolowanym podziałom komórkowym [19].

Badania prowadzone *in vitro* na mysich fibroblastach płodowych NIH3T3 wykazały, że zastosowanie inhibitorów proteosomów (bortezomib+MG132) hamowało degradację neurofibrominy, mimo stymulacji komórek czynnikami wzrostowymi. Dalsze badania nad identyfikacją białek odpowiedzialnych za ubikwitynację NF1 z zastosowaniem techniki selektywnej degradacji transkryptów z wykorzystaniem małych interferujących RNA (shRNA) wykazały, że proces ten jest zależny od obecności kuliny 3 (cullin 3) i działania kinazy białkowej C, która jest aktywowana w odpowiedzi na obecność czynników wzrostowych. W skład kompleksu odpowiedzialnego za degradację neurofibrominy dodatkowo wchodzą: białko adaptorowe KBTBD7 (kelch repeat and BTB domain containing 7), odpowiedzialne za przyłączenie substratu (NF1) do reakcji oraz białka Rbx1/2 (RING-box prortein1/2) wiążące enzym E2 odpowiedzialny za przyłączanie ubikwityny do substratu (ryc.9). Dopiero w pełni funkcjonalny kompleks inaktywuje neurofibrominę, czego efektem jest pobudzenie aktywności szlaku RAS/MAPK i innych regulowanych z udziałem NF1 [41].

Podsumowanie

Neurofibromina jest białkiem zaangażowanym w wiele procesów komórkowych - oddziałuje z różnymi białkami, przez co wpływa na aktywność wielu komórkowych szlaków sygnałowych. Jej aktywność również podlega precyzyjnej regulacji zależnej m.in. od obecności czynników wzrostowych. Udział neurofibrominy w wielu oddziaływaniach komórkowych powoduje, że zaburzenia jej funkcji wynikające z małej dostępności białka lub jego zmniejszonej aktywności będą znacząco wpływać na funkcjonowanie komórek, a tym samym całego organizmu.

Skutkiem tych zaburzeń jest nerwiakowłókniakowatość typu I, a pierwszym objawem jest obecność zmian barwnikowych, których przyczyną może być zaburzony transport melanosomów w melanocytach z udziałem neurofibrominy, jak również nieprawidłowa regulacja syntezy melaniny z udziałem szlaku RAS/MAPK. Nerwiakowłókniakowatość typu I jest również chorobą predysponującą do wystąpienia łagodnych i złośliwych nowotworów, a zwiększone ryzyko wystąpienia zmian rozrostowych może wynikać z faktu, że neurofibromina jest zaangażowana w regulację szlaków RAS/MAPK i PI3K/AKT/mTOR odpowiedzialnych m.in. za prawidłową proliferację komórek. Ponadto prawidłowa aktywność szlaków RAS/MAPK i cAMP/PKA (także regulowany z udziałem neurofibrominy) jest istotna dla rozwoju układu nerwowego, zwłaszcza morfogenezy komórek nerwowych i plastyczności synaptycznej, a tym samym niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesów uczenia się i pamięci. Zaburzenia tych procesów mogą prowadzić do specyficznych objawów neurologicznych obserwowanych u pacjentów z NF1.

Z całą pewnością, mimo intensywnych badań, nie udało się jeszcze dokładnie poznać wszystkich oddziaływań neurofibrominy, na co wskazują wyniki badań z zastosowaniem drożdżowych systemów dwuhybrydowych czy badania interakcji białkowych neurofibrominy z wykorzystaniem spektrometrii masowej [5]. Opisane do chwili obecnej oddziaływania neurofibrominy i jej rola w różnicowaniu komórek jednak w znacznym stopniu wyjaśniają szerokie spektrum objawów klinicznych obserwowanych u pacjentów z nerwiakowłókniakowatością typu I.

Podziękowania

Autorzy tekstu dziękują prof. Jerzemu Balowi za wszelkie wnikliwe uwagi dotyczące manuskryptu. Badania dotyczące patogenezy molekularnej RASopatii możliwe są dzięki finansowaniu z Narodowego Centrum Nauki (UMO-2011/01/D/NZ5/01347 i UMO-2013/09/B/NZ2/03164).

Piśmiennictwo

[1] Abramowicz A., Gos M.: Neurofibromin in neurofibromatosis type 1 - mutations in *NF1* gene as a cause of disease. Dev. Period Med., 2014; 18: 297-306

[2] Ahmadian M.R., Kiel C., Stege P., Scheffzek K.: Structural fingerprints of the Ras-GTPase activating proteins neurofibromin and p120GAP. J. Mol. Biol., 2003; 329: 699-710

[3] Ahmadian M.R., Wiesmüller L., Lautwein A., Bischoff F.R., Wittinghofer A.: Structural differences in the minimal catalytic domains of the GTPase-activating proteins $p120^{GAP}$ and neurofibromin. J. Biol. Chem., 1996; 271: 16409-16415

[4] Arun V.: Validation and Functional Characterization of Novel Neurofibromin Interacting Proteins, PhD thesis, https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/35166/11/Arun_Vedant_201303_PhD_Thesis.pdf [23.11.2014]

[5] Arun V., Wiley J.C., Kaur H., Kaplan D.R., Guha A.: A novel neurofibromin (NF1) interaction with the leucine-rich pentatricopeptide

repeat motif-containing protein links neurofibromatosis type 1 and the French Canadian variant of Leigh's syndrome in a common molecular complex. J. Neurosci. Res., 2013; 91: 494-505

[6] Arun V., Worrell L., Wiley J.C., Kaplan D.R., Guha A.: Neurofibromin interacts with the cytoplasmic dynein heavy chain 1 in melanosomes of human melanocytes. FEBS Lett., 2013; 587: 1466-1473

[7] Ballester R., Marchuk D., Boguski M., Saulino A., Letcher R., Wigler M., Collins F.: The *NF1* locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast *IRA* proteins. Cell, 1990; 63: 851-859

[8] Barron V.A., Lou H.: Alternative splicing of the neurofibromatosis type I pre-mRNA. Biosci. Rep., 2012; 32: 131-138

[9] Bikowska-Opalach B., Jackowska T.: Nerwiakowłókniakowatość typu 1 – opis obrazu klinicznego oraz molekularnych podstaw rozwoju choroby. Dev. Per. Med., 2013; 17: 334-340

[10] Bollag G., McCormick F., Clark R.: Characterization of full-length neurofibromin: tubulin inhibits Ras GAP activity. EMBO J., 1993; 12: 1923-1927

[11] Bonneau F., Lenherr E.D., Pena V., Hart D.J., Scheffzek K.: Solubility survey of fragments of the neurofibromatosis type 1 protein neurofibromin. Protein Expr. Purif., 2009; 65: 30-37

[12] Boyanapalli M., Lahoud O.B., Messiaen L., Kim B., Anderle de Sylor M.S., Duckett S.J., Somara S., Mikol D.D.: Neurofibromin binds to caveolin-1 and regulates ras, FAK, and Akt. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006; 340: 1200-1208

[13] Boyd K.P., Korf B.R., Theos A.: Neurofibromatosis type 1. J. Am. Acad. Dermatol., 2009; 61: 1-14

[14] Brannan C.I., Perkins A.S., Vogel K.S., Ratner N., Nordlund M.L., Reid S.W., Buchberg A.M., Jenkins N.A., Parada L.F., Copeland N.G.: Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. Genes Dev., 1994; 8: 1019-1029; Erratum in: Genes Dev., 1994; 8: 2792

[15] Brown J.A., Diggs-Andrews K.A., Gianino S.M., Gutmann D.H.: Neurofibromatosis-1 heterozygosity impairs CNS neuronal morphology in a cAMP/PKA/ROCK-dependent manner. Mol. Cell. Neurosci., 2012; 49: 13-22

[16] Brown J.A., Gianino S.M., Gutmann D.H.: Defective cAMP generation underlies the sentivity of CNS neurons to neurofibromatosis-1 heterozygosity. J. Neurosci., 2010; 30: 5579-5589

[17] Bryk D., Olejarz W., Zapolska-Downar D.: Kinazy aktywowane mitogenami i ich znaczenie w patogenezie miażdżycy. Postępy Hig. Med. Dośw., 2014; 68: 10-22

[18] Chudy A., Gajewska B., Gutowicz M., Barańczyk-Kuźma A.: Białka transportu wewnątrzkomórkowego: klasyfikacja, budowa i funkcje kinezyn. Postępy Hig. Med. Dośw., 2011; 65: 588-596

[19] Cichowski K., Santiago S., Jardim M., Johnson B.W., Jacks T.: Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor. Genes Dev., 2003; 17: 449-454

[20] Cui Y., Costa R.M., Murphy G.G., Elgersma Y., Zhu Y., Gutmann D.H., Parada L.F., Mody I., Silva A.J.: Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning. Cell, 2008; 135: 549-560

[21] D'Angelo I., Welti S., Bonneau F., Scheffzek K.: A novel bipartite phospholipid-binding module in the neurofibromatosis type 1 protein. EMBO Rep., 2006; 7: 174-179

[22] Dasgupta B., Dugan L.L., Gutmann D.H.: The neurofibromatosis 1 gene product neurofibromin regulates pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-mediated signaling in astrocytes. J. Neurosci., 2003; 23: 8949-8954

[23] Dasgupta B., Gutmann D.H.: Neurofibromatosis 1: closing the GAP between mice and men. Curr. Opin. Genet. Dev., 2003; 13: 20-27

[24] Daston M.M., Ratner N.: Neurofibromin, a predominantly neuronal GTPase activating protein in the adult, is ubiquitously expressed during development. Dev. Dyn., 1992; 195: 216-226

[25] Daston M.M., Scrable H., Nordlund M., Sturbaum A.K., Nissen L.M., Ratner N.: The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. Neuron, 1992; 8: 415-428

[26] De Raedt T., Maertens O., Chmara M., Brems H., Heyns I., Sciot R., Majounie E., Upadhyaya M., De Schepper S., Speleman F., Messiaen L., Vermeesch J.R., Legius E.: Somatic loss of wild type NF1 allele in neurofibromas: Comparison of NF1 microdeletion and non-microdeletion patients. Genes Chromosomes Cancer, 2006; 45: 893-904

[27] Deo M., Huang J.L., Fuchs H., de Angelis M.H., Van Raamsdonk C.D.: Differential effects of neurofibromin gene dosage on melanocyte development. J. Invest. Dermatol., 2013; 133: 49-58

[28] Diggs-Andrews K.A., Gutmann D.H.: Modeling cognitive dysfunction in neurofibromatosis-1. Trends Neurosci., 2013; 36: 237-247

[29] Diggs-Andrews K.A., Tokuda K., Izumi Y., Zorumski C.F., Wozniak D.F., Gutmann D.H.: Dopamine deficiency underlies learning deficits in neurofibromatosis-1 mice. Ann. Neurol., 2013; 73: 309-315

[30] Diwakar G., Zhang D., Jiang S., Hornyak T.J.: Neurofibromin as a regulator of melanocyte development and differentiation. J. Cell Sci., 2008; 121: 167-177

[31] Endo M., Yamamoto H., Setsu N., Kohashi K., Takahashi Y., Ishii T., Iida K., Matsumoto Y., Hakozaki M., Aoki M., Iwasaki H., Dobashi Y., Nishiyama K., Iwamoto Y., Oda Y.: Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. Clin. Cancer Res., 2013; 19: 450-461

[32] Feng L., Yunoue S., Tokuo H., Ozawa T., Zhang D., Patrakitkomjorn S., Ichimura T., Saya H., Araki N.: PKA phosphorylation and 14-3-3 interaction regulate the function of neurofibromatosis type I tumor suppressor, neurofibromin. FEBS Lett., 2004; 557: 275-282

[33] Gos M., Leszkiewicz M., Abramowicz A.: RAS/MAPK signal transduction pathway and its role in the pathogenesis of Noonan syndrome. Postępy Biochem., 2012; 58: 255-264

[34] Gregory P.E., Gutmann D.H., Mitchell A., Park S., Boguski M., Jacks T., Wood D.L., Jove R., Collins F.S.: Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. Somat. Cell Mol. Genet., 1993; 19: 265-274

[35] Guo H.F., Tong J., Hannan F., Luo L., Zhong Y.: A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in *Drosophila*. Nature, 2000; 403: 895-898

[36] Gutmann D.H., Geist R.T., Wright D.E., Snider W.D.: Expression of the neurofibromatosis 1 (*NF1*) isoforms in developing and adult rat tissues. Cell Growth Differ., 1995; 6: 315-323

[37] Gutmann D.H., Wu Y.L., Hedrick N.M., Zhu Y., Guha A., Parada L.F.: Heterozygosity for the neurofibromatosis 1 (NF1) tumor suppressor results in abnormalities in cell attachment, spreading and motility in astrocytes. Hum. Mol. Genet., 2001; 10: 3009-3016

[38] Hannan F., Ho I., Tong J.J., Zhu Y., Nurnberg P., Zhong Y.: Effect of neurofibromatosis type I mutations on a novel pathway for adenylyl cyclase activation requiring neurofibromin and Ras. Hum. Mol. Genet., 2006; 15: 1087-1098

[39] Hinman M.N., Sharma A., Luo G., Lou H.: Neurofibromatosis type 1 alternative splicing is a key regulator of Ras signaling in neurons. Mol. Cell. Biol., 2014; 34: 2188-2197

[40] Ho I.S., Hannan F., Guo H.F., Hakker I., Zhong Y.: Distinct functional domains of neurofibromatosis type I regulate immediate versus long-term memory formation. J. Neurosci., 2007; 27: 6852-6857

[41] Hollstein P.E., Cichowski K.: Identifying the ubiquitin ligase complex that regulates the NF1 tumor suppressor and Ras. Cancer Discov., 2013; 3: 880-893

[42] Hsueh Y.P., Roberts A.M., Volta M., Sheng M., Roberts R.G.: Bipartite interaction between neurofibromatosis type I protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. J. Neurosci., 2001; 21: 3764-3770

[43] Jacks T., Shih T.S., Schmitt E.M., Bronson R.T., Bernards A., Weinberg R.A.: Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in *Nf1*. Nat. Genet., 1994; 7: 353-361

[44] Johannessen C.M., Reczek E.E., James M.F., Brems H., Legius E., Cichowski K.: The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005; 102: 8573-8578

[45] Karwacki M.W., Woźniak W.: Neurofibromatosis--an inborn genetic disorder with susceptibility to neoplasia. Med. Wieku Rozwoj., 2006; 10: 923-948

[46] Kaufmann D., Müller R., Kenner O., Leistner W., Hein C., Vogel W., Bartelt B.: The N-terminal splice product *NF1-10a-2* of the *NF1* gene codes for a transmembrane segment. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002; 294: 496-503

[47] Kim H.A., Ratner N., Roberts T.M., Stiles C.D.: Schwann cell proliferative responses to cAMP and *Nf1* are mediated by cyclin D1. J. Neurosci., 2001; 21:1110-1116

[48] Knudson A.G.Jr.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1971; 68: 820-823

[49] Kötting C., Kallenbach A., Suveyzdis Y., Wittinghofer A., Gerwert K.: The GAP arginine finger movement into the catalytic site of Ras increases the activation entropy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008; 105: 6260-6265

[50] Kweh F., Zheng M., Kurenova E., Wallace M., Golubovskaya V., Cance W.G.: Neurofibromin physically interacts with the N-terminal domain of focal adhesion kinase. Mol. Carcinog., 2009; 48: 1005-1017

[51] Larizza L., Gervasini C., Natacci F., Riva P.: Developmental abnormalities and cancer predisposition in neurofibromatosis type 1. Curr. Mol. Med., 2009; 9: 634-653

[52] Le L.Q., Parada L.F.: Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. Oncogene, 2007; 26: 4609-4616

[53] Lemmon M.A.: Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. Biochem. Soc. Trans., 2004; 32: 707-711

[54] Leondaritis G., Petrikkos L., Mangoura D.: Regulation of the Ras-GTPase activating protein neurofibromin by C-tail phosphorylation: implications for protein kinase C/Ras/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway signaling and neuronal differentiation. J. Neurochem., 2009; 109: 573-583

[55] Lin Y.L., Hsueh Y.P.: Neurofibromin interacts with CRMP-2 and CRMP-4 in rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2008; 369: 747-752

[56] Lin Y.L., Lei Y.T., Hong C.J., Hsueh Y.P.: Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. J. Cell Biol., 2007; 177: 829-841

[57] Liu N., Xu N., Wei L.H., Chai G.L.: Mammalian target of rapamycin inhibitor abrogates abnormal osteoclastogenesis in neurofibromatosis type 1. Chin. Med. J., 2013; 126: 101-107

[58] Maertens O., Brems H., Vandesompele J., De Raedt T., Heyns I., Rosenbaum T., De Schepper S., De Paepe A., Mortier G., Janssens S., Speleman F., Legius E., Messiaen L.: Comprehensive *NF1* screening on cultured Schwann cells from neurofibromas. Hum. Mutat., 2006; 27: 1030-1040

[59] Mangoura D., Sun Y., Li C., Singh D., Gutmann D.H., Flores A., Ahmed M., Vallianatos G.: Phosphorylation of neurofibromin by PKC is a possible molecular switch in EGF receptor signaling in neural cells. Oncogene, 2006; 25: 735-745

[60] Martin G.A., Viskochil D., Bollag G., McCabe P.C., Crosier W.J., Haubruck H., Conroy L, Clark R., O'Connell P., Cawthon R.M., Innis M.A., McCormick F.: The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with *ras* p21. Cell, 1990; 63: 843-849

[61] Nasir-ud-Din, Kaleem A., Ahmad I., Walker-Nasir E., Hoessli D.C., Shakoori A.R.: Effect on the Ras/Raf signaling pathway of post-translational modifications of neurofibromin: in silico study of protein modification responsible for regulatory pathways. J. Cell. Biochem., 2009; 108: 816-824

[62] Neel N.F., Martin T.D., Stratford J.K., Zand T.P., Reiner D.J., Der C.J.: The RalGEF-Ral effector signaling network: the road less traveled for anti-Ras drug discovery. Genes Cancer, 2011; 2: 275-287

[63] Oliveira A.F., Yasuda R.: Neurofibromin is the major ras inactivator in dendritic spines. J. Neurosci., 2014; 34: 776-783

[64] Ozawa T., Araki N., Yunoue S., Tokuo H., Feng L., Patrakitkomjorn S., Hara T., Ichikawa Y., Matsumoto K., Fujii K., Saya H.: The neurofibromatosis type 1 gene product neurofibromin enhances cell motility by regulating actin filament dynamics via the Rho-ROCK-LIMK2-cofilin pathway. J. Biol. Chem., 2005; 280: 39524-39533

[65] Patrakitkomjorn S., Kobayashi D., Morikawa T., Wilson M.M., Tsubota N., Irie A., Ozawa T., Aoki M., Arimura N., Kaibuchi K., Saya H., Araki N.: Neurofibromatosis type 1 (NF1) tumor suppressor, neurofibromin, regulates the neuronal differentiation of PC12 cells via its associating protein, CRMP-2. J. Biol. Chem., 2008; 283: 9399-9413

[66] Starinsky-Elbaz S., Faigenbloom L., Friedman E., Stein R., Kloog Y.: The pre-GAP-related domain of neurofibromin regulates cell migration through the LIM kinase/cofilin pathway. Mol. Cell. Neurosci., 2009; 42: 278-287

[67] Suzuki H., Takahashi K., Yasumoto Ki., Fuse N., Shibahara S.: Differential tissue-specific expression of neurofibromin isoform mRNAs in rat. J. Biochem., 1996; 120: 1048-1054

[68] Thomas L., Richards M., Mort M., Dunlop E., Cooper D.N., Upadhyaya M.: Assessment of the potential pathogenicity of missense mutations identified in the GTPase-activating protein (GAP)-related domain of the neurofibromatosis type-1 (*NF1*) gene. Hum. Mutat., 2012; 33: 1687-1696

[69] Tokuo H., Yunoue S., Feng L., Kimoto M., Tsuji H., Ono T., Saya H., Araki N.: Phosphorylation of neurofibromin by cAMP-dependent protein kinase is regulated via a cellular association of N^G,N^G-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. FEBS Lett., 2001; 494: 48-53

[70] Tong J., Hannan F., Zhu Y., Bernards A., Zhong Y.: Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. Nat. Neurosci., 2002; 5: 95-96

[71] Trovó-Marqui A.B., Tajara E.H.: Neurofibromin: a general outlook. Clin. Genet., 2006; 70: 1-13

[72] Vallée B., Doudeau M., Godin F., Gombault A., Tchalikian A., de Tauzia M.L., Bénédetti H.: Nf1 RasGAP inhibition of LIMK2 mediates a new cross-talk between Ras and Rho pathways. PLoS One, 2012; 7: e47283

[73] Vandenbroucke I., Van Oostveldt P., Coene E., De Paepe A., Messiaen L.: Neurofibromin is actively transported to the nucleus. FEBS Lett., 2004; 560: 98-102

[74] Welander J., Söderkvist P., Gimm O.: The *NF1* gene: a frequent mutational target in sporadic pheochromocytomas and beyond. Endocr. Relat. Cancer, 2013; 20: C13-C17

[75] Welti S.: Biochemical Characterization of the Sec14-PH Module from the Neurofibromatosis Type I Protein, PhD Thesis http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/8902/1/PhDThesis_Final.pdf (23.11.2014)

[76] Welti S., Fraterman S., D'Angelo I., Wilm M., Scheffzek K.: The Sec14 homology module of neurofibromin binds cellular glycerophospholipids: mass spectrometry and structure of a lipid complex. J. Mol. Biol., 2007; 366: 551-562

[77] Welti S., Kühn S., D'Angelo I., Brügger B., Kaufmann D., Scheffzek K.: Structural and biochemical consequences of NF1 associated nontruncating mutations in the Sec14-PH module of neurofibromin. Hum. Mutat., 2011; 32: 191-197

[78] Williams V.C., Lucas J., Babcock M.A., Gutmann D.H., Korf B., Maria B.L.: Neurofibromatosis type 1 revisited. Pediatrics, 2009; 123: 124-133

[79] Xu G.F., Lin B., Tanaka K., Dunn D., Wood D., Gesteland R., White R., Weiss R., Tamanoi F.: The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates *ras* GTPase and complements *ira* mutants of S. cerevisiae. Cell, 1990; 63: 835-841

[80] Yan J., Chen S., Zhang Y., Li X., Li Y., Wu X., Yuan J., Robling A.G., Kapur R., Chan R.J., Yang F.C.: Rac1 mediates the osteoclast gains-in-function induced by haploinsufficiency of *Nf1*. Hum. Mol. Genet., 2008; 17: 936-948

[81] Zhu Z., Golay H.G., Barbie D.A.: Targeting pathways downstream of KRAS in lung adenocarcinoma. Pharmacogenomics, 2014; 15: 1507-1518

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.