

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.03.38-48>

Характеристика мутаций в гене *FBN1* и оценка их патогенного статуса у пациентов с синдромом Марфана

Чакова Н.Н.¹, Рудой А.С.², Бурак Е.А.¹, Валюженич Я.И.³, Долматович Т.В.¹, Ниязова С.С.¹

- 1 – Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
220072, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, д. 27
- 2 – Республиканский научно-практический центр «Кардиология»
220036, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Розы Люксембург, д.110Б
- 3 – Белорусский государственный медицинский университет
220083, Республика Беларусь, г. Минск, пр. Дзержинского, д. 83

Введение. Синдром Марфана (СМ) – одно из часто встречающихся заболеваний группы наследственных нарушений (дисплазий) соединительной ткани с распространенностью в популяции 2-3 случая на 10000 человек. Продолжительность жизни пациентов ограничивается поражениями сердечно-сосудистой системы – развитием острого расслоения грудной аорты. Диагноз устанавливается на основании Гентских критериев (2010), в которых основополагающим является обнаружение патогенной мутации в гене *FBN1*. В гене, расположенном на 15-й хромосоме и содержащем 66 экзонов (из них 65 кодирующих), на данный момент насчитывается более 3000 нуклеотидных вариантов. Базы данных патогенных мутаций постоянно пополняются сведениями о фенотипической картине уже описанных вариантов и найденных впервые.

Цель: изучить спектр мутаций в гене *FBN1* в белорусской выборке пациентов с СМ и оценить диагностическую значимость выявленных генетических вариантов.

Методы. В исследование включен 21 неродственный пациент с СМ. Для верификации диагноза всем пациентам методом NGS проведено секвенирование кодирующей последовательности. Найденные замены подтверждались прямым секвенированием по Сэнгеру. Патогенность выявленных вариантов оценивалась согласно базам данных (ClinVar, HGMD) и критериям Американского сообщества медицинских генетиков (ACMG, 2015 г.).

Результаты. У 10 из 21 (47,62 %) пациентов с клиническим диагнозом СМ выявлено 10 редких вариантов нуклеотидной последовательности гена *FBN1*, три (30%) из которых обнаружены впервые. Интерпретация патогенности в базах данных ClinVar и HGMD существенно различалась. Только один из 7 вариантов, описанных ранее, указан как патогенный в обеих базах (ClinVar, HGMD), 3 варианта имели неопределенную клиническую значимость (VUS, III класс) в базе ClinVar, при этом один из них (p.Cys1159Tyr) описан как диагностически значимый в HGMD (DM, IV–V класс). Вариант p.Asp2291Gly, представленный в ClinVar как VUS, и замена p.Cys2674Tyr, патогенная в ClinVar, отсутствовали в базе HGMD, а варианта p.Cys1956Arg, диагностически значимого в базе HGMD, не было в ClinVar. Описанный же ранее вариант p.Cys2617TrpfsTer65 на данный момент не зарегистрирован ни в одной из баз. Вариант p.Thr1020Ala был определен как VUS в обеих базах и характеризовался наиболее благоприятным течением заболевания. Три варианта обнаружены впервые и являются патогенными согласно критериям ACMG: c.3838G>C (p.Asp1280His), c.7694G>C (p.Cys2565Ser), c.7849T>C (p.Cys2617Arg). В работе приведено подробное описание фенотипического проявления новых мутаций. Большинство патогенных мутаций находились в экзонах 62 и 64.

Заключение. Обнаружено 10 редких вариантов в гене *FBN1*, 9 из которых являлись патогенными согласно критериям ACMG (2015 г.). Для 4 (40%) вариантов данные в базах ClinVar и HGMD различались. Полученные данные указывают на необходимость уточнения интерпретации патогенности некоторых вариантов в гене *FBN1*. Использование данных двух баз позволило подтвердить патогенный статус для существенно большего количества вариантов. Три новых миссенс-варианта были патогенными по предикторам *in silico* и приводили к тяжелому течению СМ, что указывает на их диагностическую значимость.

Ключевые слова: синдром Марфана, ген *FBN1*, патогенный вариант, вариант с неизвестной клинической значимостью (VUS), новый вариант последовательности ДНК.

Для цитирования: Чакова Н.Н., Рудой А.С., Бурак Е.А., Валюженич Я.И., Долматович Т.В., Ниязова С.С. Характеристика мутаций в гене *FBN1* и оценка их патогенного статуса у пациентов с синдромом Марфана. *Медицинская генетика* 2024; 23(3): 38–48.

Автор для корреспонденции: Чакова Н.Н.; e-mail: n.chakova@igc.by

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.02.2024

Characterization of mutations in the *FBN1* gene and assessment of their pathogenic status in patients with Marfan syndrome

Chakova N.N.¹, Rudoy A.S.², Burak E. A.¹, Valiuzhenich Y.I.³, Dolmatovich T.V.¹, Niyazova S.S.¹

1 – Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus
27, Akademicheskaya st., Minsk, 220072, Belarus

2 – Republican Scientific and Practical Centre of Cardiology
1105 Rosa Luxemburg st., Minsk, 220036, Belarus

3 – Belarusian State Medical University
83, Dzerzhinsky pr., Minsk, 220083, Belarus

Background. Marfan syndrome (MS) is one of the frequently occurring diseases of the connective tissue dysplasia group, with a population prevalence of 2-3 cases per 10000 people. The life expectancy of patients is limited by lesions of the cardiovascular system. Diagnosis is based on the Ghent criteria (2010), in which the detection of a pathogenic mutation in the *FBN1* gene is important. The gene, located on the 15th chromosome and containing 66 exons (65 of them coding), currently has more than 3000 nucleotide variants. Databases of pathogenic mutations are constantly updated with information about phenotypic manifestation of variants already described and those found for the first time.

Aim: to study the spectrum of mutations in the *FBN1* gene in the Belarusian sample of patients with MS and to evaluate the diagnostic significance of the identified genetic variants.

Methods. The study included 21 unrelated patients with CM. To verify the diagnosis, sequencing of coding sequence was performed in all patients by NGS method. The found substitutions were confirmed by direct Sanger sequencing. The pathogenicity of the identified variants was assessed according to databases (ClinVar, HGMD) and criteria of the American Community of Medical Geneticists (ACMG, 2015).

Results. In 10 out of 21 (47.62 %) patients with clinical diagnosis of Marfan syndrome 10 rare variants of nucleotide sequence of *FBN1* gene were detected, three (30 %) of which were detected for the first time. The interpretation of pathogenicity in the ClinVar and HGMD databases differed significantly. Only one of the 7 previously described variants is listed as a pathogenic mutation in both databases (ClinVar, HGMD), 3 variants had uncertain clinical significance (VUS, class III) in the ClinVar database, with one of them (p.Cys1159Tyr) described as diagnostically significant in HGMD (DM, class IV-V). The variant p.Asp2291Gly, represented as VUS in ClinVar, and the replacement p.Cys2674Tyr, pathogenic in ClinVar, were absent in the HGMD database, and the variant p.Cys1956Arg, diagnostically significant in the HGMD database, was not present in ClinVar. The previously described variant p.Cys2617TrpfsTer65 is currently not registered in either database. The variant p.Thr1020Ala was identified as VUS in both bases and was characterized by the most favorable course of the disease. Three variants were detected for the first time and are pathogenic according to ACMG criteria: c.3838G>C (p.Asp1280His), c.7694G>C (p.Cys2565Ser), c.7849T>C (p.Cys2617Arg). The paper provides a detailed description of the phenotypic manifestation of the new mutations. Most of the pathogenic mutations were located in exons 62 and 64.

Conclusions. Ten rare variants in the *FBN1* gene were detected, 9 of which were pathogenic according to the ACMG criteria (2015). For 4 (40%) variants the data in ClinVar and HGMD databases differed. The data obtained indicate the need to clarify the interpretation of pathogenicity of some variants in the *FBN1* gene. The use of data from the two databases allowed us to confirm the pathogenic status for a significantly larger number of variants. Three new missense variants were pathogenic by *in silico* predictors and led to a severe course of MS, indicating their diagnostic significance.

Keywords: Marfan syndrome, *FBN1* gene, pathogenic variant, variant of unknown clinical significance (VUS), new variant.

For citation: Chakova N.N., Rudoy A.S., Burak E.A., Valiuzhenich Y.I., Dolmatovich T.V., Niyazova S.S. Characterization of mutations in the *FBN1* gene and assessment of their pathogenic status in patients with Marfan syndrome. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2024; 23(3): 38-48. (In Russian)

Corresponding author: Chakova N.N.; **e-mail:** n.chakova@igc.by

Funding. The work had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 15.02.2024

Введение

Синдром Марфана (СМ) — генетическое заболевание, относящееся к группе наследственных нарушений соединительной ткани. Его распространенность в популяции составляет 2-3 случая на 10000 человек [1].

Заболевание характеризуется широким спектром клинических проявлений, затрагивающих различные системы организма. Наиболее часто нарушения происходят в сердечно-сосудистой и опорно-двигательной системах, а также поражается орган зрения. К яр-

ко выраженным признакам СМ относят деформацию грудной клетки, вывих /подвывих хрусталика, расширение/расслоение аорты и недостаточность аортального клапана. Кроме того, клиническая картина заболевания подвержена динамике, на которую оказывают влияние генетические особенности пациента, а также факторы риска [2]. Нарушения сердечно-сосудистой системы, такие как дилатация аорты, высокий риск развития аневризмы/расслоения грудного отдела аорты и других крупных сосудов, являются основными факторами, ограничивающими продолжительность жизни пациентов. В исследовании, проведенном в Дании, установлено, что продолжительность жизни людей с СМ меньше на 8-13 лет по сравнению с популяционным контролем [3]. Однако риск внезапной смерти от расслоения аорты к настоящему времени снижается благодаря лучшей диагностике и своевременному проведению операции [4].

Для постановки диагноза используются Гентские критерии (2010), в которых впервые предложено выявление патогенных мутаций в гене *FBNI* [5]. Ген *FBNI* локализован на 15-й хромосоме (15q21.1) и содержит 66 экзонов, 65 из которых являются кодирующими. Продукт этого гена является одним из самых крупных гликопротеинов в организме человека. Количество мутаций в гене *FBNI* превышает 3000 [6].

СМ имеет аутосомно-доминантный тип наследования с высокой пенетрантностью [1]. У 75% пациентов с установленной генетической причиной наблюдается семейная форма заболевания, у каждого четвертого пациента мутация возникает *de novo* [7].

Молекулярно-генетические базы данных (HGMD, ClinVar), в которых содержится информация обо всех опубликованных нуклеотидных вариантах в генах, включая *FBNI*, постоянно пополняются новыми данными за счет обследования пациентов из ранее не генотипированных популяций. При этом часто возникают вопросы с оценкой патогенности выявленных вариантов в связи с отсутствием функциональных (*in vitro* или *in vivo*) и сегрегационных исследований. Нередко в различных базах данных одному и тому же варианту присвоен разный класс патогенности. Это в свою очередь создает проблемы при использовании генетического тестирования для подтверждения диагноза. Накопление информации по каждому из вариантов способствует улучшению оценки их патогенной значимости.

Цель исследования — изучить спектр мутаций в гене *FBNI* в белорусской выборке пациентов с СМ и оценить диагностическую значимость выявленных генетических вариантов.

Методы

Объектом исследования являлся 21 неродственный белорусский пациент с СМ (17 мужчин/ 4 женщины, медиана возраста 36 [32;46]). Диагноз был поставлен на основании Гентских критериев, 2010 [5]. Всеми участниками эксперимента подписано согласие об использовании биоматериала в научных исследованиях.

Тотальную ДНК выделяли из замороженной цельной крови фенол-хлороформным методом [8]. Поиск мутаций в кодирующих последовательностях гена *FBNI* проведен методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina) с использованием коммерческого набора «TruSight™ Cardio Sequencing Panel» (Illumina). Аннотирование результатов секвенирования проводилось с применением программного обеспечения ANNOVAR [9], предназначенного для оценки выявленных вариантов на основе популяционных баз данных (1000genomes, gnomAD, Exome Variant Server, dbSNP), баз данных генетических вариантов (HGMD [10], ClinVar [11]) и предикторов *in silico* (PolyPhen-2 [12], REVEL [13], FATHMM [14], SIFT [15]). Домены белка *FBNI*, затрагиваемые выявленными мутациями, определены с использованием базы данных UniProt [16].

Патогенность выявленных вариантов оценивалась согласно критериям Американской коллегии медицинской генетики и геномики (ACMG, 2015) [17], а также в соответствии с Гентскими критериями патогенности вариантов [5].

К диагностически значимым отнесены патогенные (V класс) и вероятно патогенные (IV класс) генетические варианты. Анализировались также варианты с неопределенной клинической значимостью (VUS, III класс) в качестве потенциальных факторов риска развития СМ.

Все обнаруженные варианты III-V классов подтверждены методом прямого секвенирования по Сэнгеру с использованием реагентов BigDye® Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems» США).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведения секвенирования методом NGS у 10 из 21 (47,62 %) белорусских пациентов с клиническим диагнозом СМ выявлено 10 вариантов в гене *FBNI*. Характеристика обнаруженных нуклеотидных вариантов представлена в таблице.

Базы данных ClinVar и HGMD содержат информацию о 6 (60%) вариантах, ещё один вариант описан в ста-

тые Гусиной и соавт. [6], три варианта обнаружены впервые. У 4 вариантов данные в базах различались (таблица). Только 1 из 6 вариантов, представленных в HGMD и ClinVar, указан в качестве патогенного в обеих базах, 3 варианта имели неопределенную клиническую значимость (VUS, III класс) в базе ClinVar, при этом один из них (p.Cys1159Tyr) описан как диагностически значимый в HGMD (DM, IV–V класс). Вариант p.Asp2291Gly, представленный в ClinVar как VUS, и замена p.Cys2674Tyr, патогенная в ClinVar, отсутствовали в базе HGMD, а варианта p.Cys1956Arg, диагностически значимого в базе HGMD, не было в базе ClinVar. Соотношение выявленных и описанных ранее вариантов по классам патогенности в обеих базах представлено на рисунке.

Как видно из рисунка, использование при оценке патогенности выявленных вариантов объединенной информации из двух баз данных позволило подтвердить диагностическую значимость существенно большего количества вариантов (66,7%).

Известно, что наиболее частыми вариантами в гене *FBN1* являются миссенс-мутации, большинство из которых приводят к замене остатков цистеина в консервативных 6- и 8-цистеиновых последовательностях в EGF-подобных доменах, кальций-связывающих EGF-подобных доменах (cbEGF) и доменах трансформирующего белкового фактора роста β (TGF β). Распространены также инсерции, приводящие к вставке дополнительного цистеина в данных областях. Домены cbEGF наиболее многочисленны в фибриллин-1 и играют важную роль в конформационной стабильности белка за счет образования дисульфидных связей, а также связывания ионов кальция, необходимых для устойчивости фибриллина-1 к протеолизу. Миссенс-мутации, затрагивающие данные домены, в соответствии с Гентской классификацией определяются как патогенные [5,6]. Согласно международным данным, 25 % всех известных мутаций в гене *FBN1* представляют собой делеции или инсерции, а также нон-

Таблица. Характеристика вариантов в гене *FBN1*, обнаруженных у белорусских пациентов с CM

Table. Characteristics of *FBN1* gene variants found in Belarusian patients with Marfan syndrome

Код пациента	Нуклеотидная замена / rs	Экзон	Аминокислотная замена / MAF (gnomAD)	Домен белка	Класс мутации	
					ClinVar	HGMD
28f	c.3058A>G / rs111801777	25	p.Thr1020Ala/ 0,00033	-	VUS	VUS
75 f	c.3476G>A / rs1555398524	29	p.Cys1159Tyr/ 0.00	cbEGF-18	VUS	DM
51f	c.3838G>C / -	31	p.Asp1280His/ 0.00	cbEGF-21	_*	_*
9f	c.5866T>C / -	48	p.Cys1956Arg/ 0.00	cbEGF-33	-	DM
29f	c.6872A>G / rs370283154	57	p.Asp2291Gly/ 0.0000065	cbEGF-40	VUS	-
481c	c.7664G>T / rs1566891654	62	p.Gly2555Val/ 0.00	cbEGF-44	DM	DM
4f	c.7694G>C / rs1566891645	62	p.Cys2565Ser/ 0.00	cbEGF-44	_*	_*
8f	c.7849T>C / -	64	p.Cys2617Arg/ 0.00	cbEGF-46	_*	_*
35f	c.7851delC / -	64	p.Cys2617TrpfsTer65/ 0.00	cbEGF-46	-	-
11f	c.8021G>A / rs1555393827	64	p.Cys2674Tyr/ 0.00	cbEGF-47	DM	-

Примечания: * – новые мутации, DM – диагностически-значимая мутация (IV и V класс патогенности), VUS – вариант с неопределенной клинической значимостью (III класс), MAF – частота минорного аллеля, cbEGF- кальций-связывающий EGF-подобный домен.

Notes: * – new mutations, DM – diagnostically significant mutation (class IV and V pathogenicity), VUS – variant with uncertain clinical significance (class III), MAF – minor allele frequency, cbEGF- calcium-binding EGF-like domain.

сенс-мутации, приводящие к преждевременному стоп-кодону и появлению усеченных вариантов фибриллина-1, которые могут мешать сборке полноценных мономеров во внеклеточные микрофибриллы [18].

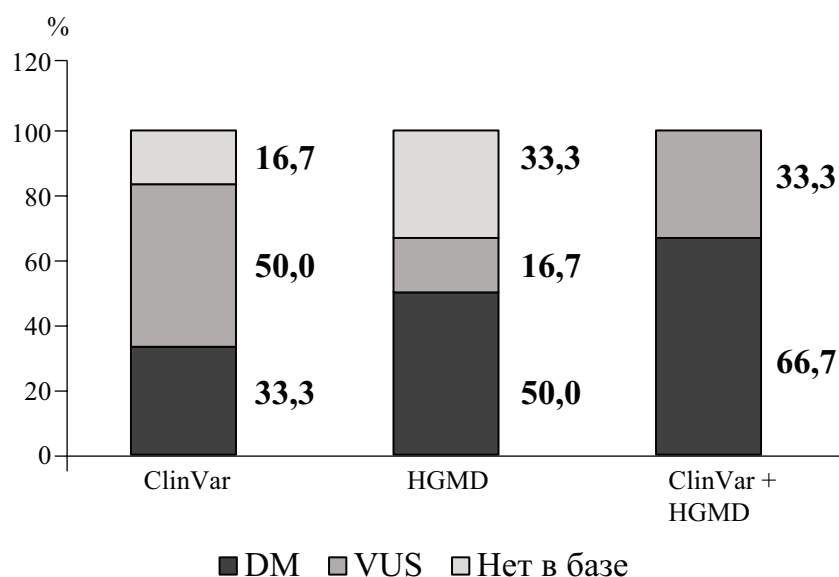
В результате проведенного исследования было выявлено 9 миссенс-вариантов, приводящих к замене аминокислот в последовательности белка. Помимо миссенс-вариантов обнаружена делеция одного нуклеотида, приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона.

Миссенс-вариант **c.7664G>T (p.Gly2555Val)**, патогенный в обеих базах данных (ClinVar и HGMD), выявлен у пациента №481с мужского пола (16 лет) с отягощенным семейным анамнезом по СМ. У пробанда имелись пограничное расширение аорты на уровне синусов Вальсальвы (34 мм Z критерий > 2,5) и полисегментарный пролапс митрального клапана (ПМК). Вариант **c.7664G>T** затрагивает 62-й кодирующий экзон гена *FBN1* и приводит к замене глицина на валин в консервативном положении 2555 в домене cbEGF-44 белка, сохраняющегося у многих групп позвоночных [19, 20]. Замена **c.7664G>T** была обнаружена у людей с фенотипической картиной, характерной для СМ [19, 21, 22]. Этот вариант не описан в популяционных базах данных (ExAC, GnomAD) [23]. Известна и другая патогенная мутация в этом же положении белка — **p.Gly2555Arg** [24], а близлежащие миссенс-варианты

(**p.Arg2554Trp**, **p.Arg2554Gln**, **p.Thr2561Pro**) также ассоциированы с этим заболеванием, что является дополнительным подтверждением функциональной значимости этой области белка.

Варианты **p.Cys1159Tyr** и **p.Cys1956Arg** описаны в качестве патогенных только в базе HGMD. В ClinVar замене **p.Cys1159Tyr** присвоен статус VUS, а замена **p.Cys1956Arg** отсутствует.

Миссенс-вариант **c.3476G>A (p.Cys1159Tyr)**, диагностически значимый согласно базе данных HGMD, обнаружен у пациента №75 мужского пола (21 год) с диагнозом СМ. У пациента №75 размер аневризмы восходящего отдела грудной аорты достигал 63 мм (Z критерий — 11,4), наблюдались врожденный подвывих обоих хрусталиков, ПМК 2 степени и аневризма межпредсердной перегородки. Кроме того, обнаружены признаки дисморфогенеза со стороны костно-мышечной системы: долихостеномиелия, врожденная деформация грудной клетки, полный синдром арахнодактилии, продольное плоскостопие, недоразгибание локтевых суставов, множественные стрии. Имелся также выраженный дефицит массы тела — индекс массы тела 15,9 кг/м². Замена **c.3476G>A** затрагивает высококонсервативный цистеин, необходимый для формирования дисульфидной связи в cbEGF-18 белка. Этот вариант не описан в популяционных базах данных (ExAC, GnomAD). Замены аминокислоты в этом



Распределение выявленных вариантов в гене *FBN1* по классам патогенности в базах HGMD и ClinVar

Distribution of identified variants in the *FBN1* gene by pathogenicity classes in HGMD and ClinVar databases

же положении: с.3475T>A (p.Cys1159Ser), с.3475T>C (p.Cys1159Arg) имеют статус патогенного и вероятно патогенного вариантов в ClinVar. Мутации в близлежащих остатках (Asp1155Asn, Asp1155Gly, Glu1158Gly, Cys1166Tyr) также ассоциированы с СМ. Оценка значимости выявленной замены позволила присвоить варианту с.3476G>A (p.Cys1159Tyr) IV класс патогенности (вероятно патогенный вариант).

Миссенс-вариант **с.5866T>C (p.Cys1956Arg)**, диагностически значимый согласно HGMD, выявлен у пациентки № 9f (48 лет). Диагноз СМ пациентке поставлен в 15 лет (признаки системного вовлечения соединительной ткани (СВСТ) 15 баллов), когда при быстром росте проявились выраженная деформация грудной клетки с незначительным нарушением функции органов дыхания. Отмечаются S-образная деформация грудного и поясничного отделов позвоночника (сколиоз грудно-поясничного отдела 4 степени), двухсторонний диспластический деформирующий артроз тазобедренных суставов (2 стадия) и умеренная протрузия обеих вертлужных впадин, продольное плоскостопие обеих стоп 1 степени с деформирующим артрозом таранно-ладьевидных сочленений обеих стоп (1 стадия). Проведено протезирование восходящего отдела аорты, аортального и митрального клапанов. Со стороны органов зрения выявлена дегенерация сетчатки, начальная катаракта левого глаза и миопия высокой степени. Миссенс-мутация с.5866T>C приводит к замене цистеина на аргинин в кодоне 1956 (p.Cys1956Arg) домена cbEGF-40 белка. Данный вариант описан у пациента с СМ, у которого клинические проявления характеризовались поражением глаз, сердечно-сосудистой системы, кожи и небольшим повреждением легочной системы [25]. Клиническими проявлениями у норвежского пациента с СМ и такой же заменой были эктазия твёрдой мозговой оболочки, нарушения в скелете, небольшие повреждения глаз и кожи [18]. Оценка значимости выявленной замены позволила присвоить мутации с.5866T>C (p.Cys1956Arg) IV класс патогенности.

Миссенс-вариант **с.8021G>A (p.Cys2674Tyr)** представлен как диагностически значимый в базе ClinVar, а в HGMD отсутствует. Вариант обнаружен у пациента №11f мужского пола 33 лет с отягощенным семейным анамнезом (отец в 34 года и младший брат в 19 лет умерли от разрыва аорты). Пациенту №11f выполнена операция по протезированию восходящего отдела аорты, аортального клапана и пластики митрального клапана. Вариант с.8021G>A приводит к замене аминокислоты цистеина в положении 2674 на тирозин в cbEGF-47 домене белка. Замена p.Cys2674Tyr

не описана в популяционных базах данных (ExAC, GnomAD). Другие миссенс-варианты (p.Cys2674Arg [26] и p.Cys2674Ser [27], затрагивающие цистеин в этом положении, зарегистрированы в базах как патогенные или вероятно патогенные.

Однонуклеотидная делеция **с.7851delC** в экзоне 64, обнаруженная у пациента №35f мужского пола (41 год) с диагнозом СМ, приводит к замещению остатка цистеина на триптофан в положении 2617 (домен cbEGF-46) и образованию преждевременного стоп-кодона в положении 2682 (p.Cys2617TrpfsTer65). Этот вариант не зарегистрирован в популяционных базах данных (ExAC, GnomAD) и в базах ClinVar, HGMD, а впервые выявлен и описан Гусиной и соавт. у ребенка пациента №35f в ходе изучения генетических причин врожденного смещения хрусталика [6]. С-конец белка блокирует преждевременную сборку фибриллина-1 путём связывания с доменами cbEGF41-43 и необходим для секреции [28]. Также известно, что усеченные транскрипты в большинстве случаев деградируют под действием нонсенс-опосредованного механизма распада мРНК, приводя к снижению или отсутствию экспрессии усеченного фибриллина-1, что увеличивает негативное влияние микрофибрилл на внеклеточный матрикс [18]. В ClinVar содержится запись о замене с.7851C>A (p.Cys2617Ter), имеющей статус патогенного варианта. Оценка значимости выявленной делеции позволила присвоить мутации с.7851delC (p.Cys2617TrpfsTer65) V класс патогенности.

В этом же кодоне 2617 нами впервые обнаружен новый, патогенный по предикторам *in silico* миссенс-вариант **с.7849T>C (p.Cys2617Arg)** у пробанда №8f мужского пола 28 лет, отец которого умер в 33 года от разрыва аорты. У родной сестры СМ проявлялся выраженной деформацией грудной клетки, потребовавшей оперативного вмешательства. У пациента имелись артерио-венозная гемангиома правого плеча, близорукий астигматизм обоих глаз, а также двусторонний коксартроз 2 стадии с кистовидной перестройкой костной ткани верхненаружного квадранта головки и шейки левой бедренной кости и продольное плоскостопие обеих стоп 2 степени. Описанный фенотип пациента указывает на диагностическую значимость выявленной мутации. Нуклеотидный вариант с.7849T>C в экзоне 64 гена *FBN1* приводит к замене цистеина на аргинин в домене cbEGF-46. В открытых базах данных в этом кодоне зарегистрированы две уникальные замены, имеющие статус патогенного и вероятно патогенного вариантов, — с.7851C>G (p.Cys2617Trp) и с.7850G>A (p.Cys2617Tyr). В экзоне 64 кодируются 46-й и 47-й

сbEGF-подобные домены. Дисульфидные связи локализуются в позициях 2611–2622, 2617–2631, 2633–2646. Положение 2617–2631 играет важную роль для формирования дисульфидной связи в кальций-связывающем EGF-подобном домене. Мутации, приводящие к нарушению формирования дисульфидной связи, могут влиять на структуру микрофибрилл [6]. Оценка значимости выявленной замены с.7849T>C (p.Cys2617Arg) позволила присвоить ей IV класс патогенности (вероятно патогенный вариант).

Еще 2 новых миссенс-варианта выявлены у пробандов №51f и №4f.

У пациента №51f мужского пола 40 лет с диагнозом СМ обнаружен новый вариант **с.3838G>C (p.Asp1280His)** в экзоне 31 гена *FBN1*, который приводит к замене аспарагиновой кислоты на гистидин в положении 1280 аминокислотной последовательности белка (домен сbEGF-21). Данный вариант затрагивает последний нуклеотид 31-го экзона, который входит в консенсусную последовательность сайта сплайсинга. Нуклеотидные замены, которые нарушают такой консервативный сайт, приводят к альтернативному варианту сплайсинга [29, 20]. Миссенс-мутация, затрагивающая аспарагиновую кислоту в положении 1280, наблюдалось у лиц с клиническими признаками СМ [30, 31]. В базе данных ClinVar в положении 1280 описаны два уникальных вероятно патогенных варианта — с.3839A>T (p.Asp1280Val) и с.3838G>A (p.Asp1280Asn). Кроме того, сообщалось о миссенс-мутациях в близлежащих остатках (p.Cys1278Ser, p.Asn1282Ser, p.Cys1284Gly, p.Cys1284Arg, p.Cys1284Tyr), являющихся причиной СМ, что подтверждает функциональную важность этой области белка. Аспарагиновая кислота в положении 1280 является высококонсервативной, и ее замена на гистидин вызывает неблагоприятные изменения белка согласно анализу *in silico*. У пациента № 51 выявлены аневризма восходящего отдела (68 мм) и корня аорты (52 мм); недостаточность аортального и митрального клапанов с регургитацией. На основании вышесказанного миссенс-замене с.3838G>C (p.Asp1280His) присвоен статус вероятно патогенной.

Новая замена **с.7694G>C (p.Cys2565Ser)** в экзоне 62 гена *FBN1* обнаружена у 48-летнего пациента № 4f мужского пола с диагнозом СМ (СВСТ 12 баллов), проявляющимся воронкообразной деформацией грудной клетки с незначительным нарушением функции органов дыхания, правосторонним сколиозом грудного отдела позвоночника, диспластическим артрозом обоих тазобедренных суставов, продольным плоскостопием левой стопы и подвывихом хрусталиков

обоих глаз. Проведены протезирование восходящего отдела аорты (61 мм) и реимплантация аортального клапана по Дэвиду. Имелась также малая аномалия сердца: трабекулярное строение верхушки левого желудочка с сетью апикальных аномально-расположенных хорд. Вариант с.7694G>C приводит к замене цистеина на серин (p.Cys2565Ser) в домене сbEGF-44. Данные аминокислоты различаются по физико-химическим свойствам. Другой патогенный вариант в этом же положении (с.7694G>A, p.Cys2565Tyr) обнаружен у пациента с семейной формой СМ из Германии [32]. Оценка значимости выявленной замены с.7694T>C (p.Cys2565Ser) позволила присвоить ей IV класс патогенности (вероятно патогенный вариант).

У двух пациентов с клиническим диагнозом СМ выявлены VUS в соответствии с базой данных ClinVar: p.Asp2291Gly (нет данных в HGMD) и p.Thr1020Ala (VUS в HGMD).

Миссенс-вариант **с.6872A>G (p.Asp2291Gly)**, отсутствующий в HGMD, выявлен у пациента №29f мужского пола 36 лет с диагнозом СМ, аневризмой восходящего отдела аорты; врожденным пороком сердца (ВПС): бicuspidальным аортальным клапаном с выраженной недостаточностью аортального и митрального клапанов. Пациенту была выполнена операция по протезированию восходящей аорты с реимплантацией аортального клапана по Дэвиду. Вариант с.6872A>G затрагивает первый нуклеотид экзона 57, в связи с чем, вероятно, может оказывать влияние на процесс сплайсинга РНК. Мутация приводит к замене аспарагиновой кислоты в кодоне 2291 на глицин (p.Asp2291Gly) в сbEGF-40 домене белка. Аспарагиновая кислота и глицин различаются по физико-химическим свойствам, в результате чего замена может влиять на вторичную структуру белка. Частота встречаемости в базе данных GnomAD — 0.000003980 [23]. Замена с.6871G>C Asp2291His описана в литературе у немецких пациентов с предполагаемым диагнозом СМ, а также у пациентов с аневризмой или расширением аорты [33]. В пользу диагностической значимости данного варианта свидетельствует наличие в базах данных ClinVar и HGMD патогенной замены аминокислоты в этом же положении, описанной у пациента с СМ с.6871G>A (p.Asp2291Asn). Мутация с.6871G>A была зарегистрирована у итальянского пациента с классическим СМ, включающим аневризму аорты. Замена p.Asp2291Asn оказывает слабое влияние на эффективность спайсинга [34], но физико-химические различия аспарагина и гистидина могут влиять на вторичную структуру фибриллина-1. Также в ClinVar зарегистрированы мутации в соседних

аминокислотных остатках (p.Cys2289Tyr, p.Glu2294Ala, p.Cys2295Arg, p.Cys2295Tyr), имеющие связь с СМ. Перечисленные данные указывают на диагностическую значимость замены p.Asp2291Gly и на необходимость его реклассификации [35].

Вариант **c.3058A>G (p.Thr1020Ala)** с неопределенной клинической значимостью согласно двум базам данных (ClinVar и HGMD) обнаружен у женщины №28f (возраст 22 года) с марфаноподобным фенотипом и ВПС: недостаточностью двустворчатого аортального клапана; Н1; ХСН ФК II по NYHA. По сравнению с другими пациентами у данной пациентки отмечен наиболее мягкий фенотип. Миссенс-вариант **c.3058A>G** приводит к замене треонина на аланин в положении 1020 (p.Thr1020Ala). Замена локализована в линкерной области белка, имеющей длину девять аминокислотных остатков и расположенной между доменами TGFβP-5 и cbEGF-15. Предикторы *in silico* подтверждают, что данная замена не влияет на структуру и функцию белка. Замена **c.3058A>G** в *FBNI* описана в ClinVar 12 раз: 9 раз как вероятно доброкачественный и 3 раза как VUS [24]. Вариант был выявлен у 12 пробандов с различными фенотипами, в основном, с аневризмой грудной аорты или марфаноидным габитусом, один пробанд также имел эктопию хрусталика. Вариант представлен в литературе у нескольких пациентов, включая одного человека с классическим СМ [36], одного человека с неполным СМ [37], одного пациента с MASS-синдромом (марфаноподобным синдромом) [38] и пациентом с двустворчатым аортальным клапаном и аневризмой корня аорты [39]. Этот вариант также был зарегистрирован у 3 пациентов с синдромом Лужана-Фринса [21,40], в том числе у двух братьев с марфаноидным габитусом и нарушениями обучаемости без пороков сердца [40]. Несмотря на частую встречаемость этого варианта в больших популяционных исследованиях (GnomAD: 0.0003302 [23], данная замена выявлена в гомозиготном состоянии только у одного индивидуума, что указывает на возможный патогенный эффект и низкую жизнеспособность этого варианта в этом случае. Кроме того, частота встречаемости этого варианта по данным базы GnomAD падает в зависимости от возраста, что не согласуется с доброкачественным статусом. Отсутствие функционального исследования данной замены также затрудняет окончательный вывод о патогенности данного варианта. В пользу диагностической значимости также может выступать более высокая частота встречаемости среди пациентов с СМ, чем в контрольных и популяционных выборках. Можно предположить, что ва-

риант p.Thr1020Ala является фактором риска и влияет на фенотипическое проявление других мутаций или участвует в полигенном контроле наследственных нарушений соединительной ткани, включая некоторые марфаноподобные синдромы.

Как показывает анализ всех выше представленных клинически значимых вариантов нуклеотидной последовательности, в 60% случаев мутация приводила к замене цистеина на другую аминокислоту, что согласуется с Гентскими критериями. Кроме того, большая часть обнаруженных замен (70%) локализована на С-конце белка (экзоны 48-62).

Подробное описание фенотипических проявлений каждой мутации способствует накоплению данных, что является основой для правильной интерпретации патогенетической значимости нуклеотидных вариантов.

Заключение

У 10 из 21 пациентов (47,62%) с СМ методом NGS выявлено 10 редких вариантов в гене *FBNI*, 9 (90 %) из них являлись диагностически значимыми согласно критериям ACMG, 2015. Все мутации были миссенс-вариантами за исключением одной делеции, приводящей к преждевременному стоп-кодону. По 4 (40%) вариантам данные в базах ClinVar и HGMD различались. Использование данных двух баз позволило подтвердить патогенный статус для большего количества вариантов. Полученные данные указывают на необходимость уточнения интерпретации патогенности некоторых вариантов в гене *FBNI*.

Выявлены три новых миссенс-варианта: **c.3838G>C (p.Asp1280His)**, **c.7694G>C (p.Cys2565Ser)**, **c.7849T>C (p.Cys2617Arg)**. Данные варианты были патогенными по предикторам *in silico* и приводили к тяжелому течению СМ, что указывает на их диагностическую значимость. Кроме того, варианты **7694G>C (p.Cys2565Ser)**, **c.7849T>C (p.Cys2617Arg)** приводили к замене цистеина на другую аминокислоту в консервативных участках кальций-связывающих EGF-подобных доменов (cbEGF), что, в соответствии с Гентской классификацией, позволяет отнести их к патогенным.

Определение патогенности выявленного генетического варианта является сложной задачей. Подтверждение патогенности новых мутаций производится на основании руководства по классификации вариантов (ACMG) с опорой на каталогизированные варианты. Иногда ни автоматизированные, ни ручной анализы не дают возможности отнести замену к числу однозначно патогенных или безвредных. В отсутствие экс-

периментальных данных по изучению трансгенных организмов с выявленной заменой существующие базы данных могут быть полезны для анализа патогенности, но необходимо пользоваться ими с осторожностью. В разных базах данных применяют разные критерии для включения мутаций, и, следовательно, данные в разных базах неодинаковы и нуждаются в уточнении. Для специалистов, опирающихся в своих исследованиях на базы данных ClinVar и HGMD, может быть неочевидно, что в настоящее время они помимо однозначно патогенных мутаций могут включать также безвредные, оцененные как патогенные, и ровно наоборот. Автоматическое использование этих баз ограничено качеством данных, представленных в них. Важно вручную проверять утверждения о патогенности мутации, сделанные в экспериментальных статьях, особенно если они не согласуются с предсказанием, сделанным базой.

Неправильно классифицированные варианты не дают пробандам, имеющим эти варианты, получать необходимую медицинскую помощь и ограничивают возможности в понимании ситуации для лечащего врача. Кроме того, ошибки в классификации вариантов могут негативно влиять на определение патогенности новых вариантов. Многие предикторы, предсказывающие влияние нуклеотидных замен, также обучаются на каталогизированных вариантах, в связи с чем, на данный момент ошибки в оценке патогенности, к сожалению, не исключены.

Ограничением данного исследования является отсутствие каскадного генетического скрининга родственников в семьях некоторых пациентов, по независящим от нас причинам. Такой скрининг играет несомненную роль в подтверждении функциональной значимости выявленных вариантов, поскольку позволяет не только провести сегрегационный анализ, но и установить изменения *de novo*, наличие которых является дополнительным доказательством патогенности.

Литература

1. Faivre L.C., Collod-Beroud G., Loeys BL et al. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. *The American Journal of Human Genetics*. 2007; 81(3): 454-466.
2. Делягин В.М., Жакупова Ж.С., Нарычева И.А., Мельникова М.Б. Синдром Марфана (принципы диагностики, клиническая картина, тактика врача). *Практическая медицина*. 2008; 4 (28): 39-43.
3. Groth K.A., Stockholm K., Hove H. et al. Causes of mortality in the Marfan syndrome (from a Nationwide Register Study). *The American journal of cardiology*. 2018;122(7):1231-1235.
4. Isekame Y., Gati S., Aragon-Martin J.A., et al. Cardiovascular Management of Adults with Marfan Syndrome. *Eur Cardiol*. 2016;11(2):102-110.
5. Loeys B.L., Dietz H.C., Braverman A.C. et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *Journal of medical genetics*. 2010; 47(7): 476-485.
6. Гусина А.А., Сталыбко А.С., Криницкая К.А. и др. Мутации в гене FBN1 у пациентов с врожденным подвывихом хрусталика при синдроме Марфана. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2020;17(1):87-100.
7. Рогожина Ю.А., Румянцева В.А., Букаева А.А., Заклязьминская Е.В. ДНК-диагностика и спектр мутаций в гене FBN1 при синдроме Марфана. *Российский кардиологический журнал*. 2015; 10 (126): 61-64.
8. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA. *Methods Mol Biol*. 1985; 2: 31-4.
9. Wang K., Li M., Hakonarson H., ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010 Sep; 38(16): 164.
10. Stenson P.D., Mort M., Ball E.V. et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Hum Genet*. 2020 Oct;139(10):1197-1207.
11. Landrum M.J., Chitipiralla S., Brown G.R. et al. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(1):835-844.
12. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4): 248-9.
13. Ioannidis N.M., Rothstein J.H., Pejaver V. et al. REVEL: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *Am J Hum Genet*. 2016 Oct 6; 99(4):877-885.
14. Shihab H.A., Gough J., Cooper D.N. et al. Predicting the Functional, Molecular and Phenotypic Consequences of Amino Acid Substitutions using Hidden Markov Models. *Hum Mutat*. 2013;34(1):57- 65.
15. Kumar P., Henikoff S., Ng P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009; 4(7):1073-81.
16. UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(1):523-531.
17. Richards S., Aziz N., Bale S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the Association for molecular pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-23.
18. Tjeldhorn L., Amundsen S.S., Barøy T. et al. Qualitative and quantitative analysis of FBN1 mRNA from 16 patients with Marfan Syndrome. *BMC Medical Genetic*. 2015;16: 1-8.
19. Tan L., Zongze L., Chengming Z. et al. FBN1 mutations largely contribute to sporadic non-syndromic aortic dissection. *Human Molecular Genetics*. 2017; 26(24): 4814-4822.
20. Zhang M.Q. Statistical features of human exons and their flanking regions. *Human molecular genetics*. 1998; 7(5): 919-932.
21. Stheneur C., Gwenaëlle C., Laurence F. et al. Identification of the minimal combination of clinical features in probands for efficient mutation detection in the FBN1 gene. *European Journal of Human Genetics*. 2009; 17(9): 1121-1128.
22. Comeglio P., Johnson P., Arno G. et al. The importance of mutation detection in Marfan syndrome and Marfan-related disorders: Report of 193 FBN1 mutations. *Human mutation*. 2007; 28(9): 928-928.
23. Chen S., Francioli L.C., Goodrich J.K. et al. A genome-wide mutational constraint map quantified from variation in 76,156 human genomes. *Nature*. 2022; 625(7993):92-100.

24. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2023 July 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
25. Rand-Hendriksen S., Tjeldhorn L., Lundby R. et al. Search for correlations between FBN1 genotype and complete Ghent phenotype in 44 unrelated Norwegian patients with Marfan syndrome. *Am J Med Genetka*. 2007 Sep 1;143(17):1968-77.
26. Baudhuin L.M., Kluge M.L., Kotzer K.E. et al. Variability in gene-based knowledge impacts variant classification: an analysis of FBN1 missense variants in ClinVar. *European Journal of Human Genetics*. 2019; 27(10): 1550-1560.
27. National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000451315.2], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000451315.2> (accessed Jan. 14, 2024)
28. Chen Z.X., Jia W.N., Jiang Y.X. Genotype-phenotype correlations of marfan syndrome and related fibrillinopathies: Phenomenon and molecular relevance. *Front Genet*. 2022 Aug 16;13:943083.
29. Buratti E., Chivers M., Královicová J. et al. Aberrant 5' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic acids research*. 2007; 35(13): 4250-4263.
30. Groth K.A., Kodolitsch Y.V., Kutsche K. et al. Evaluating the quality of Marfan genotype–phenotype correlations in existing FBN1 databases. *Genetics in Medicine*. 2017; 19(7): 772-777.
31. Madam L., Szakszon K., Pfliegler G. et al. FBN1 gene mutations in 26 Hungarian patients with suspected Marfan syndrome or related fibrillinopathies. *Journal of biotechnology*. 2019; 301: 105-111.
32. Renner S., Schüler H., Alawi M. et al. Next-generation sequencing of 32 genes associated with hereditary aortopathies and related disorders of connective tissue in a cohort of 199 patients. *Genetics in Medicine*. 2019; 21(8): 1832-1841.
33. Waldmüller S., Müller M., Warnecke H. et al. Genetic testing in patients with aortic aneurysms/dissections: a novel genotype/phenotype correlation. *European Journal of cardio-thoracic Surgery*. 2007; 31(6): 970-975.
34. Evangelisti L., Lucarini L., Attanasio M. et al. A single heterozygous nucleotide substitution displays two different altered mechanisms in the FBN1 gene of five Italian Marfan patients. *European journal of medical genetics*. 2010; 53(5): 299-302.
35. National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000581358.1], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000581358.1> (accessed Jan. 14, 2024).
36. Tiecke F., Katzke S., Booms P. et al. Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype–phenotype correlations in FBN1 exons 24–40. *European Journal of Human Genetics*. 2001; 9(1): 13-21.
37. Attanasio M., Lapini I., Evangelisti L. et al. FBN1 mutation screening of patients with Marfan syndrome and related disorders: detection of 46 novel FBN1 mutations. *Clinical genetics*. 2008; 74(1): 39-46.
38. Woederchak-Donahue W., VanSant-Webb C., Tvrdik T. et al. Clinical utility of a next generation sequencing panel assay for Marfan and Marfan-like syndromes featuring aortopathy. *American Journal of Medical Genetics*. 2015; 167(8): 1747-1757.
39. Girdauskas E., Geist L., Disha K. et al. Genetic abnormalities in bicuspid aortic valve root phenotype: preliminary results. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2017; 52(1): 156-162.
40. Giorgio E., Brussino A., Biamino E. et al. Exome sequencing in children of women with skewed X-inactivation identifies atypical cases and complex phenotypes. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2017; 21(3): 475-484.

References

1. Faivre L.C., Collod-Beroud G., Loeys BL et al. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. *The American Journal of Human Genetics*. 2007; 81(3): 454-466.
2. Delyagin V.M., Zhakupova ZH.S., Narycheva I.A., Melnikova M.B. Синдром Марфана (принципы диагностики, клиническая картина, тактика врача) [Marfan syndrome (principles of diagnosis, clinical picture, doctor's tactics)]. *Prakticheskaya meditsina* [Practical medicine]. 2008; 4 (28): 39-43. (In Russ.)
3. Groth K.A., Stochholm K., Hove H. et al. Causes of mortality in the Marfan syndrome (from a Nationwide Register Study). *The American journal of cardiology*. 2018;122(7):1231-1235.
4. Isekame Y., Gati S., Aragon-Martin J.A., et al. Cardiovascular Management of Adults with Marfan Syndrome. *Eur Cardiol*. 2016;11(2):102-110.
5. Loeys B.L., Dietz H.C., Braverman A.C. et al. The revised Ghent nomenclature for the Marfan syndrome. *Journal of medical genetics*. 2010; 47(7): 476-485.
6. Gusina A.A., Stalybko N.S., Krinitskaya K.A., et al. Mutatsii v gene FBN1 u patsientov s vrozhdennym podvyvikhom khrustalika pri sindrome Marfana [FBN1 gene mutations in patients with congenital ectopia lentis caused by Marfan syndrome]. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series]. 2020;17(1):87-100. (In Russ.)
7. Rogozhina Yu.A., Rumyantseva V.A., Bukaeva A.A., Zaklyazminskaya E.V. DNK-diagnostics i spektr mutatsiy v gene FBN1 pri sindrome Marfana [DNA diagnostics and mutation spectrum of the gene FBN1 in Marfan's syndrome]. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal* [Russian Journal of Cardiology]. 2015;10(10):61-64. (In Russ.)
8. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA. *Methods Mol Biol*. 1985; 2: 31-4.
9. Wang K., Li M., Hakonarson H., ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010 Sep; 38(16): 164.
10. Stenson P.D., Mort M., Ball E.V. et al. The Human Gene Mutation Database (HGMD): optimizing its use in a clinical diagnostic or research setting. *Hum Genet*. 2020 Oct;139(10):1197-1207.
11. Landrum M.J., Chitipiralla S., Brown G.R. et al. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(1):835-844.
12. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4): 248-9.
13. Ioannidis N.M., Rothstein J.H., Pejaver V. et al. REVEL: An ensemble method for predicting the pathogenicity of rare missense variants. *Am J Hum Genet*. 2016 Oct 6; 99(4):877-885.
14. Shihab H.A., Gough J., Cooper D.N. et al. Predicting the Functional, Molecular and Phenotypic Consequences of Amino Acid Substitutions using Hidden Markov Models. *Hum Mutat*. 2013;34(1):57- 65.
15. Kumar P., Henikoff S., Ng P.C. Predicting the effects of coding nonsynonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009; 4(7):1073-81.
16. UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(1):523-531.
17. Richards S., Aziz N., Bale S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the Association for molecular pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-23.

18. Tjeldhorn L., Amundsen S.S., Barøy T. et al. Qualitative and quantitative analysis of FBN1 mRNA from 16 patients with Marfan Syndrome. *BMC Medical Genetic*. 2015;16: 1-8.
19. Tan L., Zongze L., Chengming Z. et al. FBN1 mutations largely contribute to sporadic non-syndromic aortic dissection. *Human Molecular Genetics*. 2017; 26(24): 4814-4822.
20. Zhang M.Q. Statistical features of human exons and their flanking regions. *Human molecular genetics*. 1998; 7(5): 919-932.
21. Stheneur C., Gwenaëlle C., Laurence F. et al. Identification of the minimal combination of clinical features in probands for efficient mutation detection in the FBN1 gene. *European Journal of Human Genetics*. 2009; 17(9): 1121-1128.
22. Comeglio P., Johnson P., Arno G. et al. The importance of mutation detection in Marfan syndrome and Marfan-related disorders: Report of 193 FBN1 mutations. *Human mutation*. 2007; 28(9): 928-928.
23. Chen S., Francioli L.C., Goodrich J.K. et al. A genome-wide mutational constraint map quantified from variation in 76,156 human genomes. *Nature*. 2022; 625(7993):92-100.
24. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2023 July 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
25. Rand-Hendriksen S., Tjeldhorn L., Lundby R. et al. Search for correlations between FBN1 genotype and complete Ghent phenotype in 44 unrelated Norwegian patients with Marfan syndrome. *Am J Med Genetka*. 2007 Sep 1;143(17):1968-77.
26. Baudhuin L.M., Kluge M.L., Kotzer K.E. et al. Variability in gene-based knowledge impacts variant classification: an analysis of FBN1 missense variants in ClinVar. *European Journal of Human Genetics*. 2019; 27(10): 1550-1560.
27. National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000451315.2], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000451315.2> (accessed Jan. 14, 2024)
28. Chen Z.X., Jia W.N., Jiang Y.X. Genotype-phenotype correlations of marfan syndrome and related fibrillinopathies: Phenomenon and molecular relevance. *Front Genet*. 2022 Aug 16;13:943083.
29. Buratti E., Chivers M., Kráľovicová J. et al. Aberrant 5' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic acids research*. 2007; 35(13): 4250-4263.
30. Groth K.A., Kodolitsch Y.V., Kutsche K. et al. Evaluating the quality of Marfan genotype–phenotype correlations in existing FBN1 databases. *Genetics in Medicine*. 2017; 19(7): 772-777.
31. Madam L., Szakszon K., Pfliegler G. et al. FBN1 gene mutations in 26 Hungarian patients with suspected Marfan syndrome or related fibrillinopathies. *Journal of biotechnology*. 2019; 301: 105-111.
32. Renner S., Schüler H., Alawi M. et al. Next-generation sequencing of 32 genes associated with hereditary aortopathies and related disorders of connective tissue in a cohort of 199 patients. *Genetics in Medicine*. 2019; 21(8): 1832-1841.
33. Waldmüller S., Müller M., Warnecke H. et al. Genetic testing in patients with aortic aneurysms/dissections: a novel genotype/phenotype correlation. *European Journal of cardio-thoracic Surgery*. 2007; 31(6): 970-975.
34. Evangelisti L., Lucarini L., Attanasio M. et al. A single heterozygous nucleotide substitution displays two different altered mechanisms in the FBN1 gene of five Italian Marfan patients. *European journal of medical genetics*. 2010; 53(5): 299-302.
35. National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000581358.1], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000581358.1> (accessed Jan. 14, 2024).
36. Tiecke F., Katzke S., Booms P. et al. Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype–phenotype correlations in FBN1 exons 24–40. *European Journal of Human Genetics*. 2001; 9(1): 13-21.
37. Attanasio M., Lapini I., Evangelisti L. et al. FBN1 mutation screening of patients with Marfan syndrome and related disorders: detection of 46 novel FBN1 mutations. *Clinical genetics*. 2008; 74(1): 39-46.
38. Wooderchak-Donahue W., VanSant-Webb C., Tvrdik T. et al. Clinical utility of a next generation sequencing panel assay for Marfan and Marfan-like syndromes featuring aortopathy. *American Journal of Medical Genetics*. 2015; 167(8): 1747-1757.
39. Girdauskas E., Geist L., Disha K. et al. Genetic abnormalities in bicuspid aortic valve root phenotype: preliminary results. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2017; 52(1): 156-162.
40. Giorgio E., Brussino A., Biamino E. et al. Exome sequencing in children of women with skewed X-inactivation identifies atypical cases and complex phenotypes. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2017; 21(3): 475-484.