

Молекулярно-генетический анализ 617 российских пациентов с клиническим диагнозом «нейрофиброматоз»: новые патогенные и редкие непатогенные генетические варианты

Пашченко М.С.¹, Карандашева К.О.¹, Кузнецова Е.Б.^{1,2}, Анисимова И.В.¹, Бессонова Л.А.¹, Галкина В.А.¹, Гусева Д.М.¹, Демина Н.А.¹, Макиенко О.Н.¹, Маркова Т.В.¹, Матющенко Г.Н.¹, Петухова М.С.¹, Семенова Н.А.¹, Танас А.С.^{1,3}, Залетаев Д.В.^{1,2}, Стрельников В.В.^{1,3}

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,

Москва, 115522, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: christinavader@gmail.com

² — ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, 119991, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; e-mail: zalnem@mail.ru

³ — ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Москва, 117997, ул. Островитянова, д. 1; e-mail: tanas80@gmail.com

Актуальность. При нейрофиброматозе первого и второго типа патогенные мутации распределены вдоль кодирующих областей генов *NF1* и *NF2* равномерно, при этом более чем в 50% случаев заболевание является результатом мутации *de novo*. Как следствие, поиск патогенной мутации у пациента является особенно трудоемким, и каталоги патогенных и непатогенных генетических вариантов являются необходимым вспомогательным материалом в работе врача-генетика. **Цель.** Определить спектры генетических нарушений у российских больных нейрофиброматозом; охарактеризовать ранее не описанные патогенные генетические варианты и непатогенные генетические варианты с низкой популяционной частотой. **Материалы и методы.** Исследование проведено на материале ДНК лимфоцитов периферической крови и/или опухолевого материала 617 пациентов. Высокопроизводительное параллельное секвенирование (NGS) проводили на приборах Ion Torrent PGM и Ion Torrent S5 с использованием панели праймеров, охватывающей экзоны генов *NF1* и *NF2*, включая нетранслируемые области, а также прилегающие к экзонам участки интронов (20–70 п.н.). Верификацию патогенных генетических вариантов осуществляли секвенированием по Сэнгеру, поиск протяженных делеций генов *NF1* и *NF2* — методом MLPA. **Результаты.** Проведена комплексная молекулярно-генетическая диагностика нарушений генов *NF1* и *NF2* у 617 пациентов. В 303 случаях выявлены нарушения в гене *NF1* и в 19 случаях — *NF2*. **Выводы.** Охарактеризовано 69 ранее не описанных патогенных вариантов (68 — в гене *NF1*, 1 — в гене *NF2*), а также 68 редких непатогенных генетических вариантов генов *NF1* и *NF2*. Большинство непатогенных генетических вариантов представлено синонимичными однонуклеотидными заменами и нуклеотидными заменами в нетранслируемых регионах, которые особенно сложны для интерпретации при проведении медико-генетического консультирования.

Ключевые слова: нейрофиброматоз, нейрофиброматоз 1 типа, нейрофиброматоз 2 типа, высокопроизводительное параллельное секвенирование, *NF1*, *NF2*, NGS, MLPA.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках государственного задания на выполнение НИР в 2018 году.

Genetic analysis of 617 Russian neurofibromatosis patients: novel pathogenic and rare non-pathogenic mutations

Pashchenko M.S.¹, Karandasheva K.O.¹, Kuznetsova E.B.^{1,2}, Anisimova I.V.¹, Bessonova L.A.¹, Galkina V.A.¹, Guseva D.M.¹, Demina N.A.¹, Makienko O.N.¹, Markova T.V.¹, Matyushchenko G.N.¹, Petuhova M.S.¹, Semenova M.A.¹, Tanas A.S.^{1,3}, Zaletaev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.^{1,3}

¹ — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115522, Moskvorechye st.1, e-mail: christinavader@gmail.com

² — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya st. 8, e-mail: kuznetsova@epigenetic.ru

³ — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, 117997, Ostrovityanova St, 1, e-mail: tanas80@gmail.com

Background. In cases of neurofibromatosis type 1 and type 2, pathogenic mutations are distributed evenly along the coding regions of the *NF1* and *NF2* genes. Herewith, in more than 50% of cases, the disease is the result of a *de novo* mutation. Therefore, the search for a causative mutation is particularly time-consuming and the catalogs of pathogenic and non-pathogenic genetic variants

are an indispensable assistance handbook for geneticists in their work. Objective. To determine the spectrum of genetic alterations in Russian neurofibromatosis patients and to characterize novel pathogenic mutations and rare non-pathogenic genetic variants in the NF1 and NF2 genes. Material and methods. The study was carried out on the peripheral blood lymphocyte and/or tumor tissue DNA samples from 617 patients. NGS was performed on the Ion Torrent PGM and Ion Torrent S5 sequencing machines using NF1 and NF2 AmpliSeq gene panel. Gene panel encompasses exons of the NF1 and NF2 genes, adjacent intron segments (20-70 bp), 3'UTRs, and 5'UTRs. Sanger sequencing was used to verify pathogenic genetic variants and the MLPA method was used to search for NF1 and NF2 gross deletions. Result. Complex molecular genetic diagnostics of the NF1 and NF2 alterations was accomplished for 617 patients. The NF1 and NF2 mutations were detected in 303 and 19 cases, respectively. Conclusion. We have characterized 69 novel pathogenic mutations, 68 in the NF1 gene, and 1 in the NF2 gene, as well as 68 rare non-pathogenic genetic variants. Most non-pathogenic genetic variants are represented by synonymous SNPs and nucleotide substitutions in untranslated regions, which are particularly difficult to interpret during medical-genetic counseling.

Key words: neurofibromatosis, neurofibromatosis type 1, neurofibromatosis type 2, NF1, NF2, NGS, MLPA.

Введение

Нейрофиброматоз — группа наследственных заболеваний различной этиологии с аутосомно-доминантным типом наследования, характеризующихся развитием опухолей эктодермального происхождения и поражением кожных покровов.

Различают нейрофиброматоз первого типа, нейрофиброматоз второго типа, шванноматоз и фенотипически схожие с ними состояния [1]. Трудности дифференциальной диагностики данных заболеваний обусловлены их выраженным клиническим полиморфизмом и зависимым от возраста дебютом симптомов, что определяет особую важность ДНК-диагностики в установлении окончательного диагноза [2].

Нейрофиброматоз первого типа (НФ-1, OMIM #162200) — высокочастотное заболевание, является одной из наиболее распространенных моногенных наследственных патологий, его популяционная частота составляет 1:3000 новорожденных [3, 4]. К фенотипическим проявлениям НФ-1 относят опухоли (преимущественно эктодермального происхождения), когнитивные нарушения (задержки психомоторного и психоречевого развития), аномалии развития костного скелета, макроцефалию, наличие характерных пигментных пятен на коже цвета «*cafe-au-lait*», гамартозы радужной оболочки глаза, а также ряд других клинических признаков [5]. Этиологическим фактором развития НФ-1 являются структурные нарушения в гене-онкосупрессоре *NF1*, кодирующем белок нейрофибромин, вовлеченный в регуляторный путь Ras-MAPK [6, 7]. Более чем в 50% случаев заболевание обусловлено мутацией *de novo* [8].

Нейрофиброматоз второго типа (НФ-2, OMIM #101000) встречается с частотой 1:25000 [9]. НФ-2 характеризуется развитием множественных опухолей в ЦНС и по ходу периферических нервов, наиболее характерным симптомом при данной патологии является наличие двусторонних вестибулярных шванном. Возраст манифестации 18—20 лет [10, 11]. Развитие НФ-2 обусловлено мутацией в гене-супрессоре опухолевого роста *NF2*. Ген *NF2* кодирует белок мерлин, в норме регулирующий актинообусловленное движение

клетки. Потеря экспрессии с обоих аллелей приводит к нарушению контактного торможения клеточного роста [12, 13].

Спектр мутационных событий, описанных в генах *NF1* и *NF2*, чрезвычайно широк и охватывает однонуклеотидные замены, инделы и протяженные делеции, распределенные вдоль генов относительно равномерно [14]. Комплексное молекулярно-генетическое исследование большой выборки пациентов с клиническим диагнозом *нейрофиброматоз* позволяет охватить полный спектр генетических нарушений, характерных для данной патологии.

Материалы и методы

Исследование проведено на материале ДНК лимфоцитов периферической крови и/или фиксированных формалином опухолевых образцов, полученных от 617 пациентов с клиническим диагнозом *нейрофиброматоз* (НФ-1, НФ-2, неуточненный нейрофиброматоз), предоставленных ФГБНУ «МГНЦ».

Выделение ДНК из биоматериала, изготовление библиотек для NGS, высокопроизводительное секвенирование на приборах Ion Torrent PGM и Ion S5 System (Thermo Fisher Scientific, USA), подтверждение выявленных NGS вариантов у пробанда и членов семьи секвенированием ДНК по Сэнгеру, выявление протяженных делеций методом MLPA, фрагментный анализ проводили согласно описанной ранее медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики нейрофиброматоза [15].

Для оценки клинической значимости генетических вариантов использовали базы данных LOVD, HGMD, CLINVAR. Анализ патогенности выявленных генетических вариантов с популяционной частотой не более 0,5%, не имеющих представления в указанных базах данных, проводили на основании сегрегационного анализа. При выявлении у пациента патогенного варианта с доказанной клинической значимостью, все остальные генетические варианты, выявленные у этого пациента, классифицировали как непатогенные.

Результаты и обсуждение

Патогенные генетические варианты

В рамках настоящего исследования проведен поиск структурных нарушений в генах *NF1* и *NF2* с применением комплексного подхода, включающего NGS и MLPA, у 617 пациентов, что позволило выявить патогенные генетические варианты в 52% случаев (табл. 1).

У 303 пациентов были обнаружены патогенные генетические варианты в гене *NF1*. По полученным данным, основным типом структурных нарушений гена *NF1*, приводящих к развитию нейрофиброматоза, являются нонсенс-мутации и мутации со сдвигом рамки считывания (35,0% и 26,1% патогенных вариантов, соответственно). Также были обнаружены миссенс-мутации (17,5%), мутации в сайтах сплайсинга (14,2%), инделы без сдвига рамки считывания (1,6%) и протяженные делеции (5,6%). Детектированы протяженные делеции всего гена и прилежащих участков генома — 10/17, нескольких экзонов — 4/17 или единичных экзонов — 3/17. Патогенные генетические варианты, детектированные в гене *NF1* и не описанные ранее (68), представлены в табл. 2.

Патогенные генетические варианты в гене *NF2* были выявлены у 19 пациентов. Примечательно, что все четыре выявленные миссенс-мутации располагаются в экзоне 15 гена *NF2*, однако малый размер выборки не позволяет сделать вывод о статистической значимости данного явления. Был детектирован лишь один не описанный ранее патогенный генетический вариант — делеция со сдвигом рамки считывания c.33delC:p.F11fs.

Непатогенные генетические варианты

Мы предполагаем, что наличие у пациента одного патогенного варианта с доказанной клинической значимостью позволяет считать все остальные выявленные у него генетические варианты непатогенными с определенной долей вероятности, соответствующей популяци-

онной частоте заболевания (вероятность ошибки $3,3 \times 10^{-4}$ и 4×10^{-5} для *NF1* и *NF2* соответственно). В нашем исследовании непатогенными были признаны 68 вариантов с популяционными частотами, не превышающими 0,5% (табл. 3).

У 295 пациентов (47,8%) не удалось обнаружить молекулярно-генетического подтверждения клинического диагноза, что может быть обусловлено:

1) особенностями выборки: у части пациентов единственным клиническим симптомом является единичное пятно «cafe-au-lait»;

2) проблемами дифференциальной диагностики: нельзя исключить включение в исследуемую выборку пациентов со шванноматозом или другими клинически схожими заболеваниями.

Список литературы

1. Kresak JL, Walsh M. Hereditary Cancer Syndromes in Children: Neurofibromatosis: A Review of NF1, NF2, and Schwannomatosis. *Journal of pediatric genetics*. 2016 Jun;5(2):98.
2. Ferner RE, Huson SM, Thomas N, Moss C, Willshaw H, Evans DG, Upadhyaya M, Towers R, Gleeson M, Steiger C, Kirby A. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1 (NF1). *Journal of medical genetics*. 2006(14):81-88.
3. Friedman JM. Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *American journal of medical genetics*. 1999 Mar 26;89(1):1-6.
4. Шнайдер НА. Нейрофиброматоз 1-го типа: этиопатогенез, клиника, диагностика, прогноз. *Международный неврологический журнал*. 2007(5):162-7.
5. Rasmussen SA, Yang Q, Friedman JM. Mortality in neurofibromatosis 1: an analysis using US death certificates. *The American Journal of Human Genetics*. 2001 May 1;68(5):1110-8.
6. Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, Weiss R. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*. 1990 Aug 10;62(3):599-608.
7. Cichowski K, Jacks T. NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):593-604.

Типы патогенных вариантов в генах *NF1* и *NF2*
в выборке 617 российских пациентов с клиническим диагнозом «нейрофиброматоз»

Таблица 1

Тип мутации	Ген			
	<i>NF1</i>		<i>NF2</i>	
	Всего	Новые	Всего	Новые
Нонсенс-мутации	106	10	7	0
Мутации сайта сплайсинга	43	15	0	0
Инделы со сдвигом рамки	79	29	6	1
Инделы без сдвига рамки	5	3	0	0
Миссенс-мутации	53	11	4	0
Протяженные делеции	17		2	
Всего	303 (94,1%)	73	19 (5,9%)	1

Таблица 2

Патогенные генетические варианты в гене *NF1* (NM_000267), впервые выявленные в настоящем исследовании

Генетический вариант		Критерии патогенности*
Нонсенс-мутации		
c.T240G:p.Y80X c.C1174T:p.Q392X c.C1191A:p.C397X c.C1726T:p.Q576X c.G1942T:p.E648X	c.C2560T:p.Q854X c.G3100T:p.E1034X c.A3847T:p.K1283X c.A4900T:p.K1634X c.C7446G:p.Y2482X	PVS1, PS2, PM2, PP4 (патогенный вариант)
Миссенс-мутации		
c.G5943C:p.Q1981H		PS1, PS2, PM2, PP4 (патогенный вариант)
c.T2984G:p.L995R c.G5442C:p.Q1814H c.G5938C:p.G1980R c.T3505C:p.Y1169H c.T4859G:p.I1620S		PS2, PM2, PM5, PP4 (патогенный вариант)
c.505_506CT:p.E169L c.C1423G:p.L475V c.G1642C:p.A548P c.T2681C:p.F894S c.T3557A:p.I1186N		PS2, PM2, PP3, PP4 (вероятно патогенный вариант)
Инделы со сдвигом рамки считывания		
c.384delC:p.N128fs c.426delA:p.L142fs c.495_498del:p.T165fs c.650delA:p.E217fs c.654delG:p.K218fs c.691dupT:p.E230fs c.705_711del:p.Y235fs c.836dupA:p.E279fs c.1017_1018del:p.N339fs c.1131_1134del:p.I377fs c.1164delT:p.388fs c.1866dupT:p.C622fs c.1325_1328del:p.M442fs c.2208_2212del:p.N736fs c.2489_2490del:p.D830fs	c.2866dupA:p.D955fs c.2996delT:p.V999fs c.3044_3045del:p.L1015fs c.3463_3464insCA:p.A1155fs c.4025_4026insAA:p.M1342fs c.4376dupT:p.L1459fs c.4424delT:p.L1475fs c.4533delA:p.G1511fs c.5311delT:p.C1771fs c.6149delA:p.Q2050fs c.6787_6790del:p.T2263fs c.7038delG:p.L2346fs c.7266_7267insAA:p.L2422fs c.7647_7648del:p.R2549fs	PVS1, PS2, PM2, PP4 (патогенный вариант)
Мутации сайта сплайсинга		
c.204+2T>A c.288+2T>G c.586+1->TTA c.1063-3insA c.1527+4_1527+7del4 c.2002-2A>C c.2325+1G>T	c.2851-2T>C c.3113+2T>G c.3708+1G>A c.4110+2_4110+5del4 c.4367+2dupT c.6642-2A>G c.7806+2T>C	PVS1, PS2, PM2, PP4 (патогенный вариант)
Инделы без сдвига рамки считывания		
c.2707_2713del:p.901_905 c.4307_4309del:p.1436_1437del c.2702_2713del:p.901_905del		PS2, PM2, PM4, PP3, PP4 (патогенный вариант)
Примечание. * Критерии патогенности генетических вариантов определены согласно руководству по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования (MPS) [16].		

Непатогенные генетические варианты в NF1 (NM_000267) и NF2 (NM_000268)

Ген	Миссенс	Синонимичные	3'UTR	
NF1	c.A239C:p.Y80S c.G862A:p.V288M c.T5587C:p.F1863L c.A6316G:p.I2106V c.C3374T:p.A1125V c.A436G:p.S146G	c.G654A:p.K218K c.A3270G:p.G1090G c.G5706A:p.T1902T c.A5847G:p.R1949R c.T6687C:p.V2229V c.A7305G:p.K2435K c.G8088A:p.P2696P c.C435T:p.L145L c.T8436C:p.N2812N	c.*49T>C c.*64_*65insC c.*65G>C c.*196delT c.*498_*503del c.*584G>C c.*807delT c.*830A>T c.*1479A>G c.*1736C>A	c.*1899A>G c.*1944C>T c.*3030A>T c.*3469A>C c.*3471T>C c.*3473C>T c.*2808G>C c.*782T>A c.*2551A>G c.*3248G>A
	5'UTR			
	c.-22G>C c.-41G>T c.-372C>G			
NF2	c.C1882T:p.T480K c.G1611T:p.E537D c.T766C:p.F256L c.G1522A:p.D508N	c.T1143C:p.A381A c.C768T:p.F256F c.C459T:p.Y153Y c.G1749A:p.Q583Q c.C651T:p.Y217Y	c.*277C>T c.*336G>A c.*841T>C c.*1087C>T c.*2365C>T c.*2501C>T c.*3133A>G c.*3478delT c.*3479delT c.*3575G>A	c.*3692C>T c.*839G>A c.*3397T>C c.*3164T>C c.*675A>G c.*876C>T c.*691C>T c.*929A>G c.*477G>A
	5'UTR			
	c.-90del c.-361C>T			

8. Barton B, North K. Social skills of children with neurofibromatosis type 1. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2004;46(8):553-563.

9. Asthagiri AR, Parry DM, Butman JA, Kim HJ, Tsilou ET, Zhuang Z, Lonser RR. Neurofibromatosis type 2. *The Lancet*. 2009 Jun 6;373(9679):1974-86.

10. Thomas G, Merel P., Sanson M. et al. Neurofibromatosis type 2. *European Journal of Cancer*. 1994;30(13):1981-1987.

11. Evans G. R., Lloyd S. K. W., Ramsden R. T. Neurofibromatosis type 2. *Medical Genetics in the Clinical Practice of ORL*. Karger Publishers. 2011(70):91-98.

12. McClatchey AI, Giovannini M. Membrane organization and tumorigenesis — the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes & development*. 2005 Oct 1;19(19):2265-77.

13. Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI. NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by

destabilizing adherens junctions. *Genes & development*. 2003 May 1;17(9):1090-100.

14. Alkindy A, Chuzhanova N, Kini U, Cooper DN, Upadhyaya M. Genotype-phenotype associations in neurofibromatosis type 1 (NF1): an increased risk of tumor complications in patients with NF1 splice-site mutations? *Human genomics*. 2012 Dec;6(1):12.

15. Чаплыгина МС, Кузнецова ЕБ, Танас АС и др. Результаты использования новой медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики нейрофиброматоза. *Медицинская генетика*. 2016;15(11):24-8.

16. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заклязьминская Е.В., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). *Медицинская генетика*. 2017;16(7):4-17.