

Соматический мозаицизм при нейрофиброматозе первого типа

Карандашева К.О.¹, Пащенко М.С.¹, Дёмина Н.А.¹, Акимова И.А.¹, Макиенко О.Н.¹, Петухова М.С.¹, Бессонова Л.А.¹, Анисимова И.В.¹, Танас А.С.^{1,3}, Залетаев Д.В.^{1,2}, Стрельников В.В.^{1,3}, Кузнецова Е.Б.^{1,2}

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»
115522, г. Москва, ул. Москворечье д., 1

² — ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет),
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³ — ГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

Актуальность. Нейрофиброматоз первого типа является одним из наиболее распространенных моногенных заболеваний. Этиологическим фактором его развития является патогенная мутация в гене *NF1*. Однако у части пациентов не удается достичь молекулярно-генетического подтверждения клинического диагноза. Мы полагаем, что в некоторых случаях это может быть обусловлено соматическим мозаицизмом с малой долей клеток, несущих патогенный аллель, в анализируемом образце биологического материала. Аллели с низкой представленностью отсеиваются общепринятыми фильтрами программного обеспечения при поиске генетических вариантов методом высокопроизводительного параллельного секвенирования (ВПС) и/или не детектируются визуально за счет слияния с фоновым шумом при анализе результатов секвенирования по Сэнгеру.

Цель. Поиск патогенных мозаичных генетических вариантов у пациентов с нейрофиброматозом первого типа без выявленных стандартными методами герминальных мутаций в гене *NF1*.

Материалы и методы. Исследование проведено на материале ДНК лимфоцитов периферической крови 275 пациентов, объединенных клиническим диагнозом нейрофиброматоз первого типа и отсутствием герминальных мутаций в генах *NF1* и *NF2* по результатам стандартных лабораторных исследований. Поиск точковых мутаций осуществляли методом ВПС на платформе Ion Torrent. Дизайн панели праймеров включал экзоны, прилегающие к ним интронные сегменты (20-70 п.н.), а также 3'UTR и 5'UTR генов *NF1* и *NF2*. Исключение протяженных делеций в *NF1* и *NF2* осуществляли методом MLPA. С целью поиска мозаичных генетических вариантов был разработан и проведен углубленный анализ данных ВПС, основанный на биоинформатических и статистических подходах. Для верификации выявленных мозаичных патогенных генетических вариантов использовали секвенирование ДНК по Сэнгеру и гетеродуплексный анализ.

Результаты. Патогенные соматические мутации в гене *NF1* выявлены в 12 из 275 образцов (4,4%) ДНК больных, у которых были исключены герминальные мутации. В 8 образцах наличие мутантного аллеля было подтверждено альтернативными методами.

Выводы. ДНК-диагностика доминантно наследуемых заболеваний требует особых подходов, учитывающих явление соматического мозаицизма. Предложенный метод позволяет выявить генетические варианты, представленные с малой аллельной частотой, без увеличения глубины секвенирования исследуемого образца и может быть применен для ретроспективного анализа данных ВПС с целью повышения качества ДНК-диагностики.

Ключевые слова. нейрофиброматоз, *NF1*, соматический мозаицизм, высокопроизводительное параллельное секвенирование, NGS.

Для цитирования: Карандашева К.О., Пащенко М.С., Дёмина Н.А., Акимова И.А., Макиенко О.Н., Петухова М.С., Бессонова Л.А., Анисимова И.В., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б. Соматический мозаицизм при нейрофиброматозе первого типа. *Медицинская генетика* 2019; 18(5): 28-36.

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.05.28-36

Автор для корреспонденции: Карандашева Кристина Олеговна, e-mail: karandasheva@epigenetic.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования России на выполнение НИР в 2019 году.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 31.05.2019

Somatic mosaicism in neurofibromatosis type 1

Karandasheva K.O.¹, Pashchenko M.S.¹, Demina N.A.¹, Akimova I.A.¹, Makienco O.N.¹, Petuhova M.S.¹, Bessonova L.A.¹, Anisimova I.V.¹, Tanas A.S.^{1,3}, Zaletaev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.^{1,3}, Kuznetsova E.B.^{1,2}

¹ — Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechie street, 1, 115522 Moscow, Russia

² — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya st. 8, 119991, Moscow, Russian Federation

³ — Pirogov Russian National Research Medical University Ostrovityanova st. 1, 117997 Moscow, Russia.

Background. Neurofibromatosis type 1 is one of the most common monogenic disorders. A pathogenic mutation in *NF1* is the etiological factor of neurofibromatosis type 1. Nevertheless, not all patients receive molecular genetic verification of the clinical diagnosis. We believe that this may be due to a somatic mosaicism with a small fraction of pathogenic allele, which is neglected by the NGS analysis software and/or is undetectable by Sanger sequencing due to noisy background.

Objective. To detect pathogenic mosaic mutations in cases of neurofibromatosis type 1 without germline genetic variants.

Material and methods. Two hundred seventy five peripheral blood lymphocyte DNA samples from patients with NF1 and without germline mutation were retrospectively analyzed. DNA samples were sequenced with Ion PGM and Ion S5 NGS systems. Gene panel design included *NF1* and *NF2* genes: exons, adjacent intron segments (20-70 b.p.), 3'UTRs and 5'UTRs. Samples were also tested using MLPA in order to exclude deletions in *NF1* and *NF2*. We developed and implemented the pipeline to search mosaic cases using bioinformatics approaches. All newly detected mutations were evaluated by Sanger sequencing and by heteroduplex analysis.

Result. We have identified new pathogenic mutations in *NF1* for 12 patients (4.4%) and verified 8 of them using alternative methods.

Conclusion. Dominant disorders, like neurofibromatosis type 1, require a detailed bioinformatic analysis of NGS results with respect to somatic mosaicism. Our approach makes it possible to identify genetic variants with low representation of a pathogenic allele without increasing the sequencing depth of the sample under study and can be used for retrospective analysis of NGS data in order to improve the quality of DNA diagnostics.

Key words. neurofibromatosis, *NF1*, genetic mosaicism, NGS.

For citation: Karandasheva K.O., Pashchenko M.S., Demina N.A., Akimova I.A., Makienco O.N., Petuhova M.S., Bessonova L.A., Anisimova I.V., Tanas A.S., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V., Kuznetsova E.B. Somatic mosaicism in neurofibromatosis type 1. *Medical genetics* 2019; 18(5): 28-36. [In Rus.].

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.05. 28-36

Corresponding author. Karandasheva Kristyna, e-mail karandasheva@epigenetic.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

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

Accepted: 31.05.2019

Введение

Нейрофиброматоз первого типа (НФ-1) — аутосомно-доминантное заболевание с высокой пенетрантностью, обусловленное нарушениями в гене-супрессоре опухолевого роста *NF1* (Ensembl#_ENSG00000196712), локализованном на хромосоме 17q11.2. Ген *NF1* кодирует белок нейрофибромин (UniProt#_P21359) — негативный регулятор Ras-опосредованного сигналинга в пути Ras-МАРК. Потеря экспрессии обоих аллелей гена *NF1* приводит к перманентной активации Ras-зависимых сигнальных путей, способствуя опухолеобразованию [1].

В базе данных HGMD (www.hgmd.cf.ac.uk) на 2018 г. зарегистрировано более 2600 патогенных мутаций в гене *NF1*, приводящих к развитию клинических проявлений НФ-1. Спектр мутационных событий разнообразен и представлен однонуклеотидными заменами и инделами, распределенными вдоль гена относительно равномерно, а также протяженными делециями, за-

хватывающими от одного экзона до полной последовательности гена.

Для гена *NF1* характерна высокая частота возникновения мутаций *de novo*: более 50% пациентов с клиническим диагнозом *нейрофиброматоз первого типа* не имеют семейной истории [2, 3]. Темп мутирования гена *NF1* оценивается как один из наиболее высоких среди генов известных наследственных заболеваний человека — 1 на 10 000 гамет [4], что может быть объяснено протяженностью гена и его организацией (350 т.п.н., 60 экзонов) [5] или избирательностью репарационных систем клетки [6].

Несмотря на узнаваемый фенотип НФ-1, в настоящее время существуют проблемы с дифференциальной клинической диагностикой заболевания и с молекулярно-генетической диагностикой. Часть пациентов с НФ-1 не получают молекулярно-генетического подтверждения клинического диагноза [7, 8, 9].

Чаще всего дифференциальная диагностика НФ-1 проводится с нейрофиброматозом второго типа, однако отдельные клинические признаки НФ-1 могут наблюдаться при других генетических заболеваниях (шванноматозе, рассеянном липоматозе, синдромах Легиуса, Линча, LEOPARD, Макьюна-Олбрайта, Нунан и Протея) [10,11,12,13].

Молекулярно-генетическая диагностика затруднена вследствие отсутствия «горячих точек», протяженности гена *NF1*, наличия большого числа гомологичных локусов в геноме человека, гомополимерных участков и большого количества GC в составе гена [14, 15].

Мы полагаем, что низкая частота выявляемости мутаций у пациентов с НФ-1 отчасти обусловлена ограничениями методов высокопроизводительного параллельного секвенирования (ВПС) и секвенирования по Сэнгеру в отношении поиска коротких генетических вариантов при мозаичных формах генетических заболеваний, которые составляют до 17,5% случаев при аутосомно-доминантном типе наследования [16, 17].

Мозаичные формы наследственных заболеваний являются результатом соматических мутаций на одном из этапов эмбриогенеза. Как следствие, часть клеток организма имеет нормальный генотип, что осложняет диагностику, так как ткань, включённая в исследование, может не содержать искомого генетического варианта, а при низкой доле мозаицизма патогенный вариант может не преодолеть порога аналитической чувствительности диагностического метода, что приведет к ложноотрицательному результату [16, 21].

Соматический мозаицизм при НФ-1 подразделяют на генерализованную и локализованную (сегментарную) формы, отражающие предполагаемое время мутационного события [26]. У пациентов с генерализованной мозаичной формой НФ-1 гиперпигментированные пятна на коже и нейрофибромы не ограничены определенным сегментом тела, что делает их фенотип клинически неотличимым от классического НФ-1, обусловленного герминальной мутацией в гене *NF1* [26, 27, 31]. Для пациентов с локализованной (сегментарной) формой НФ-1 характерно одностороннее полное или частичное поражение какого-либо кожного сегмента, на котором могут присутствовать пятна кофейного цвета и нейрофибромы как изолированно, так и одновременно [18–20]. Зарегистрирован случай сегментарного НФ-1, представленного изолированной плексиформной нейрофибромой [28].

Определение формы мозаицизма важно для прогноза вероятности рождения здорового потомства. При генерализованной форме вероятность того, что ребенок унаследует патогенный генетический вариант, прямо пропорциональна доле клеток с мутантным аллелем в пу-

ле половых клеток родителя. При сегментарном НФ-1 предполагается что в ткани гонад родителя отсутствуют клетки, несущие патогенный аллель, однако данное предположение требует доказательств, так как описаны случаи гоносомного мозаицизма, изначально диагностированные как сегментарные мозаичные формы [29, 34].

У пациентов с сегментарной формой заболевания мутация в крови как правило не определяется стандартными методами ДНК-диагностики, однако может быть детектирована в других тканях.

Наиболее вероятным механизмом формирования мозаичных генотипов признано возникновение соматической мутации на одном из этапов эмбрионального развития. Другой моделью, описывающей данное явление, является ревертантный (обратный) мозаицизм. При ревертантном мозаицизме клетка с патогенным аллелем возвращается к состоянию дикого типа в результате обратной мутации, митотической рекомбинации, геной конверсии или нерасхождения хромосом [30]. Ревертантный мозаицизм был зарегистрирован у пары монозиготных близнецов, дискордантных по клиническим признакам НФ-1 [32], у другой пары дискордантных монозиготных близнецов ревертантный механизм был опровергнут [33].

В данном исследовании проведен ретроспективный анализ данных ВПС образцов ДНК пациентов с клиническим диагнозом НФ-1, у которых не было найдено мутаций в гене *NF1* при первичном анализе методами ВПС и мультиплексной лигазозависимой амплификацией зондов (MLPA), что для части исследуемой выборки может быть обусловлено соматическим мозаицизмом с малой представленностью патогенного аллеля в исследуемой ткани.

Материалы и методы

Исследуемая выборка

В исследование включили 275 человек, объединенных клиническим диагнозом *нейрофиброматоз первого типа*, без герминальных мутаций в белок-кодирующих областях генов *NF1* и *NF2*. Возраст пациентов варьировал от 1 месяца до 76 лет.

Материал

В качестве материала для исследования использовали ДНК лимфоцитов периферической крови. Выделение ДНК из лимфоцитов проводили в соответствии со стандартным протоколом фенол-хлороформной экстракции.

Секвенирование было осуществлено на приборах Ion PGM и Ion S5 (Life Technologies, США) с использованием технологии таргетного секвенирования Ion

AmpliSeq, основанной на мультиплексной полимеразной цепной реакции. Дизайн панели праймеров включал экзоны, прилежащие к ним участки интронов (20–70 п.н. от интрон-экзонной границы), 3'- и 5'-нетранслируемые области генов *NF1* и *NF2* [22].

Для биоинформатического анализа данных ВПС использовали программное обеспечение, ПО) Torrent Suite в составе Torrent Base Caller (TBC), Torrent Mapping Alignment program (TMAP), Torrent Variant Caller (TVC) с параметрами, рекомендованными разработчиком ПО.

Исключение протяженных делеций генов *NF1* и *NF2* проводили методом MLPA (MRC-Holland, Нидерланды).

С целью поиска мозаичных генетических вариантов мы провели углубленный биоинформатический анализ данных ВПС, включающий разделение прочтений в соответствии с принадлежностью пулу праймеров и исключение нуклеотидных последовательностей, картированных вне целевых участков, предопределенных дизайном эксперимента. Это позволило снизить вклад нецелевой амплификации и ошибок картирования в оценку аллельной частоты (AF) генетических вариантов, подробно описанный в предыдущем исследовании [23]. Последующий поиск генетических вариантов осу-

ществляли с использованием ПО TVC с релаксированными порогами специфичности: $AF \geq 0,05$, глубина покрытия (DP) не менее 20 прочтений. Генетические варианты, наблюдаемые в исследуемой выборке систематически, исключили, расценивая их как ошибки секвенирования, обусловленные используемой технологической платформой или дизайном панели праймеров. Были исключены из анализа и распространенные в популяции непатогенные полиморфизмы.

Для валидации выявленных мозаичных генетических вариантов использовали секвенирование по Сэнгеру и гетеродуплексный анализ. Хроматограммы, полученные в результате секвенирования по Сэнгеру, анализировали с использованием ПО SeqBase, позволяющего повысить чувствительность выявления вариантов путем независимого определения базовых линий в спектральных каналах отдельных нуклеотидов [24].

Результаты и обсуждение

Мозаичные генетические варианты

У 275 пациентов, не получивших молекулярно-генетического подтверждения клинического диагноза НФ-1

Таблица 1

Патогенные и потенциально патогенные мозаичные генетические варианты в гене *NF1*, выявленные в настоящем исследовании

Код пациента	Геномные координаты мутации	Номенклатура мутации	AF	DP
A	chr17:29528166	NF1:NM_000267:exon10: c.C1174T:p.Q392X	0,296	27
B	chr17:29664881	NF1:NM_000267:exon43: c.G6624A:p.W2208X	0,073	1707
C	chr17:29527461	NF1:NM_000267:exon9: c.C910T:p.R304X	0,150	40
D	chr17:29533324	NF1:NM_000267:exon12: c.1325_1328del:p.M442fs	0,119	630
E	chr17:29556079	NF1:NM_000267:exon21: c.C2446T:p.R816X	0,235	757
F	chr17:29496924	NF1:NM_000267:exon5: c.495_498del:p.T165fs	0,051	79
G	chr17:29496924	NF1:NM_000267:exon5: c.495_498del:p.T165fs	0,234	64
H	chr17:29654703	NF1:NM_000267:exon37: c.5392_5403del:p.1798_1801del	0,217	105
I	chr17:29657474	NF1:NM_000267:exon38: c.5707delT:p.L1903X	0,096	135
J	chr17:29653172	NF1:NM_000267:exon36: c.C5107T:p.Q1703X	0,074	1141
K	chr17:29548899	NF1:NM_000267:exon15: c.1673delT:p.I558fs	0,091	41
L	chr17:29580009	NF1:NM_001042492:exon31: c.4164_4165AC:p.NK1388_1389KQ	0,144	254

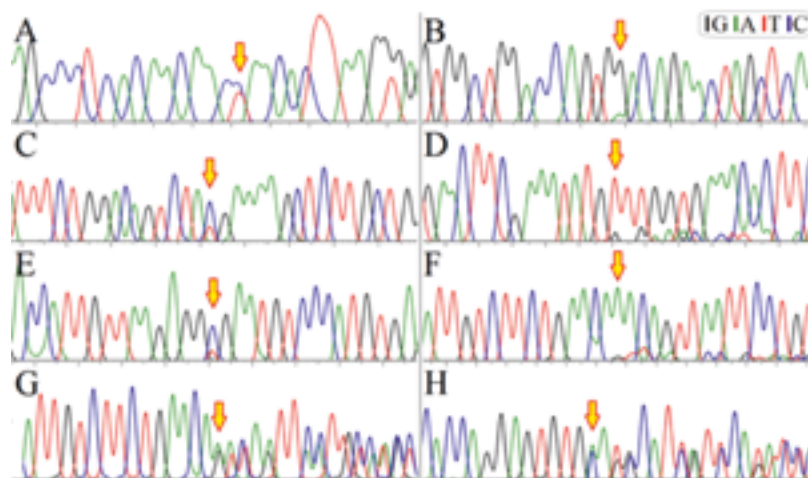


Рис. 1. Результаты валидации методом секвенирования по Сэнгеру генетических вариантов, выявленных при ВПС.

А. Мозаичный вариант NF1:NM_000267:exon10:c.C1174T: p.Q392X; В. Мозаичный вариант NF1:NM_000267:exon43:c.G6624A: p.W2208X; С. Мозаичный вариант NF1:NM_000267:exon9:c.C910T: p.R304X; D. Мозаичный вариант NF1:NM_000267:exon12:c.1325_1328del:p.M442fs; E. Мозаичный вариант NF1:NM_000267:exon21:c.C2446T:p.R816X; F. Мозаичный вариант NF1:NM_000267:exon5:c.495_498del: p.T165fs, реверс-комплемент; G. Гетерозиготный вариант NF1:NM_000267:exon5:c.495_498del: p.T165fs; H. Гетерозиготный вариант NF1:NM_000267:exon37:c.5392_5403del:p.1798_1801del.

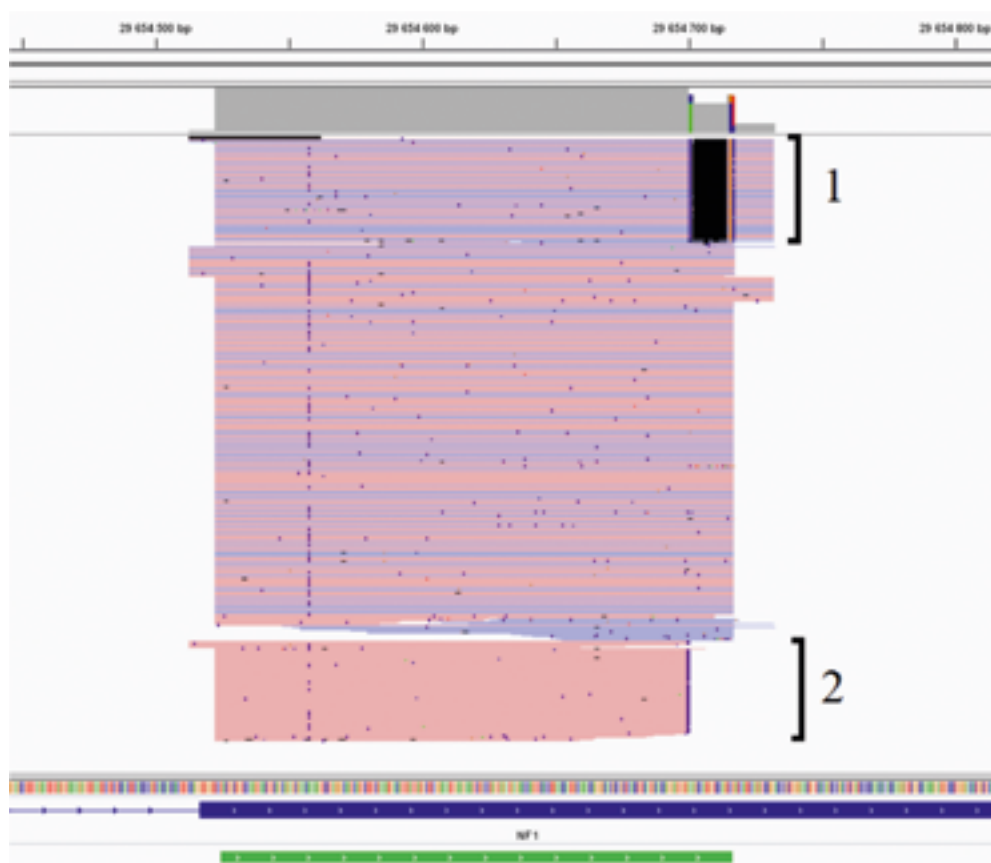


Рис. 2. Визуализация генетического варианта NF1:NM_000267:exon37:c.5392_5403del:p.1798_1801del в образце пациента Н программой просмотра результатов ВПС IGV (Integrative Genomics Viewer). 1. Корректное выравнивание прочтений с остатком праймера, полученных с альтернативного аллеля. 2. Неверное выравнивание прочтений с редуцированным праймером, полученных с альтернативного аллеля.

по результатам стандартных молекулярно-генетических тестов, было выявлено 509 потенциально патогенных мозаичных генетических вариантов. Из них было отобрано 12 вариантов, соответствующих классам «патогенный» или «вероятно патогенный» согласно рекомендациям по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования [25] (табл. 1).

Генетические варианты в образцах пациентов А-Н были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру (рис. 1). Соотношение аллелей, наблюдаемое на хроматограмме, соответствует картине соматического мозаицизма в данных ВПС для образцов А-Г.

Генетические варианты в образцах пациентов Г и Н по результатам секвенирования по Сэнгеру, могут быть охарактеризованы как гетерозиготные, хотя по результатам ВПС определена частота альтернативного аллеля ~0,2. Вероятность преуменьшения аллельной частоты гетерозиготных вариантов при ВПС возрастает со снижением глубины покрытия.

Вариант NF1:NM_000267:exon37:c.5392_5403del:p.1798_1801del, выявленный в образце пациента Н, расположен близко к концу таргетного региона, что

оказало влияние на качество выравнивания прочтений, полученных с альтернативного аллеля, относительно референсного генома (рис. 2). В данном случае

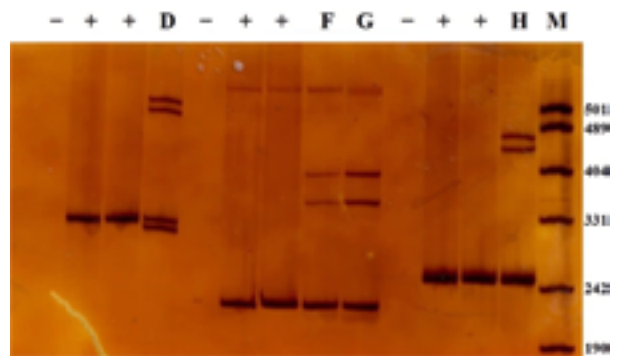


Рис. 3. Подтверждение генетических вариантов методом анализа гетеродуплексов.

(-) отрицательный контроль; (+) контрольная ДНК (здорового донора); M. маркер pUC/Mspl; D. NF1:NM_000267:exon12:c.1325_1328del:p.M442fs; F,G. NF1:NM_000267:exon5:c.495_498del:p.T165fs; H. NF1:NM_000267:exon37:c.5392_5403del:p.1798_1801del

Таблица 2

Фенотипы пациентов с мозаичными мутациями в NF1

Код пациента	Пол	Возраст текущий; манифестации, г.	Гиперпигментные пятна (локализация)	Нейрофибромы	Другие проявления
А	жен	25; <1	множественные	единичные мелкие (тело)	эпилепсии в пубертатном возрасте, веснушки (туловище, конечности)
В	жен	11; 7	3 крупных (подмышка, грудь, рука)	единичная (на лице)	частые головные боли
С	жен	н./д.; <1		н./д.	
Д	жен	37; <1	2 (поясница)	множественные (с 21 года)	веснушки в подмышечной области, дистрофия пояснично-крестцового отдела позвоночника
Е	муж	1; <1	множественные (живот, спина, бедра)	отсутствуют	н./д.
Г	жен	<1; <1	3 крупных, множество небольших		н./д.
Г	жен	39; <1	множественные	множественные (с 32 лет)	н./д.
Н	жен	<1; <1	1 крупное (грудь, спина), множественные небольшие (левое плечо, правая половина живота, спина)	н./д.	преаурикулярный привесок, эпикант
И	жен			н./д.	
Ж	муж	11; 9	множественные	отсутствуют	водянка оболочек яичек, задержка психо-речевого развития
К	жен	н./д.	множественные		н./д.
Л	жен	1; <1	1 крупное (бедро), множественные мелкие	н./д.	расширение боковых желудочков головного мозга

Примечание: н./д – нет данных

при полной редукции праймера нуклеотидная последовательность прочтения не обладает достаточной длиной для адекватного выравнивания, и отличие от референсного генома расценивается как инсерция. Однако прочтения с остаточным праймером могут быть выровнены более корректно, благодаря большей протяженности последовательностей, фланкирующих анализируемый генетический вариант.

Всем пациентам был проведен гетеродуплексный анализ, подтвердивший наличие аллеля, отличного от референсного генома, в образцах пациентов D, F, G, H (рис. 3).

Генетические варианты в образцах I-L не подтвердились альтернативными методами молекулярной диагностики (секвенирование по Сэнгеру, гетеродуплексный анализ), возможно, вследствие их малой аллельной частоты.

Фенотипы пациентов с мозаичными генетическими вариантами

У пациентов с обнаруженными мозаичными мутациями отмечается ранняя манифестация заболевания и фенотип, включающий пятна цвета «кофе с молоком» и нейрофибромы, характерный для классической формы НФ-1 (табл. 2).

Клинико-генетических корреляций или отличий фенотипических проявлений от классической формы НФ-1, обусловленной герминальной мутацией, у пациентов с мозаичными генетическими вариантами в гене *NF1* не выявлено.

Полученные результаты подтверждают принципиальную возможность выявления мозаичных мутаций при НФ-1 с использованием ВПС и технологии таргетного секвенирования Ion AmpliSeq, несмотря на недостаточную чувствительность технологических платформ, основанных на ионном полупроводниковом секвенировании, в отношении чтения нуклеотидных последовательностей со сложным контекстом. Однако вопросы баланса чувствительности и специфичности данного подхода, и, следовательно, необходимости разработки новых методов молекулярно-генетической диагностики в отношении мозаичных генотипов НФ-1, остаются открытыми.

Список литературы

- Gutmann D.H., Ferner R.E., Listerick R.H., Korf B.R., Wolters P.L., Johnson K.J. Neurofibromatosis type 1. Nature Reviews Disease Primers. 2017 Feb 23;3:17004.
- Calì F., Chiavetta V., Ruggeri G., Piccione M., Selicorni A., Palazzo D., Bonsignore M., Cereda A., Elia M., Failla P., Figura M.G. Mutation spectrum of NF1 gene in Italian patients with neurofibromatosis type 1 using Ion Torrent PGM™ platform. European journal of medical genetics. 2017 Feb 28;60(2):93-9.
- Kresak J.L., Walsh M. Neurofibromatosis: a review of NF1, NF2, and schwannomatosis. Journal of pediatric genetics. 2016 Jun;5(02):098-104.
- Rad E., Tee A.R. Neurofibromatosis type 1: Fundamental insights into cell signalling and cancer. In: Seminars in cell & developmental biology 2016 Apr 1 (Vol. 52, pp. 39-46). Academic Press.
- Шнайдер Н.А., Шаповалова Е.А. Нейрофиброматоз 1-го типа (болезнь Реклингхаузена). Вопросы практической педиатрии. 2011;6(1):83-8.
- Supek F., Lehner B. Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome. Nature. 2015 May;521(7550):81.
- Valero M.C., Martín Y., Hernández-Imaz E., Hernández A.M., Meleán G., Valero A.M., Rodríguez-Álvarez F.J., Tellería D., Hernández-Chico C. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. The Journal of Molecular Diagnostics. 2011 Mar 1;13(2):113-22.
- Xu W., Yang X., Hu X., Li S. Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing. International journal of molecular medicine. 2014 Jul 1;34(1):53-60.
- Пашенко М.С., Карандашева К.О., Кузнецова Е.Б., Анисимова И.В., Бессонова Л.А., Галкина В.А., Гусева Д.М., Демина Н.А., Макиенко О.Н., Маркова Т.В., Матюшенко Г.Н., Петухова М.С., Семенова Н.А., Танаас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Молекулярно-генетический анализ 617 российских пациентов с клиническим диагнозом «нейрофиброматоз»: новые патогенные и редкие непатогенные генетические варианты. Медицинская генетика. 2018;17(11):20-24.
- Ferner R.E., Huson S.M., Thomas N., Moss C., Willshaw H., Evans D.G., Upadhyaya M., Towers R., Gleeson M., Steiger C., Kirby A. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. Journal of medical genetics. 2007 Feb 1;44(2):81-8.
- Spatola M., Wider C., Kuntzer T., Croquelois A. PTPN11 mutation manifesting as LEOPARD syndrome associated with hypertrophic plexi and neuropathic pain. BMC neurology. 2015 Dec;15(1):55.
- Duarte M.L., Santos L.R., Duarte E.R., Abreu F.P., Ferreira J.B. Proteus Syndrome-A Rare Disease. Int J Radiol Radiat Ther. 2017;4(5):00113.
- Ольшанская А.С., Дюжакова А.В., Артюхов И.П., Шнайдер Н.А., Дмитренко Д.В., Карачева Ю.В. Нейрофиброматоз 1-го типа или гигантский меланоцитарный невус: проблемы диагностики. Русский журнал детской неврологии. 2017(2).
- Philpott C., Tovell H., Frayling I.M., Cooper D.N., Upadhyaya M. The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. Human genomics. 2017 Dec;11(1):13.
- Pasmant E., Parfait B., Luscan A., Goussard P., Briand-Suleau A., Laurendeau I., Fouveau C., Leroy C., Montadert A., Wolkenstein P., Vidaud M. Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations?. European Journal of Human Genetics. 2015 May;23(5):596.
- Qin L., Wang J., Tian X., Yu H., Truong C., Mitchell J.J., Wierenga K.J., Craigen W.J., Zhang V.W., Wong L.J. Detection and quantification of mosaic mutations in disease genes by next-generation sequencing. The Journal of Molecular Diagnostics. 2016 May 1;18(3):446-53.
- Biesscker L.G., Spinner N.B. A genomic view of mosaicism and human disease. Nature Reviews Genetics. 2013 May;14(5):307.
- Chu C.H., Chou T.C., Liu C.I., Hsu C.S., Chan J.Y., Ou C.L. Multiple segmental neurofibromatosis: Report of two cases with different presentations. Hong Kong Journal of Dermatology & Venereology. 2016 Mar 1;24(1):34-9.
- García-Romero M.T., Parkin P., Lara-Corrales I. Mosaic neurofibromatosis type 1: a systematic review. Pediatric dermatology. 2016 Jan;33(1):9-17.

20. Tinschert S., Naumann I., Stegmann E., Buske A., Kaufmann D. Thiel G., Jenne D.E. Segmental neurofibromatosis is caused by somatic mutation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *European Journal of Human Genetics*. 2000 Jun;8(6):455.
21. Gajicka M. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Molecular Genetics and Genomics*. 2016 Apr 1;291(2):513-30.
22. Чаплыгина М.С., Кузнецова Е.Б., Танас А.С., Бессонова Л.А., Матюшенко Г.Н., Галкина В.А., Петухова М.С., Анисимова И.В., Демина Н.А., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Результаты использования новой медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики нейрофиброматоза. *Медицинская генетика*. 2016;15(11):24-28.
23. Карандашева К.О., Аношкин К.И., Володин И.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Танас А.С. Исключение неверно картированных прочтений при таргетном высокопроизводительном секвенировании ДНК с использованием технологии Ion AmpliSeq. *Медицинская генетика*. 2018;17(5):19-22.
24. <http://www.epigenetic.ru/projects/seqbase>
25. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заключьминская Е.В., Костарев А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). *Медицинская генетика*. 2017;16(7):4-17.
26. Ruggieri M., Huson S.M. The clinical and diagnostic implications mosaicism in the neurofibromatoses. *Neurology*. 2001; 56(11):1433-1443.
27. Upadhyaya M., Cooper D.N., editors. *Neurofibromatosis type 1: molecular and cellular biology* (p. 153). Springer Science & Business Media; 2013 Jan 29.
28. Beert E., Brems H., Renard M., Ferreiro J.F., Melotte C., Thoelen R., De Wever I., Sciot R., Legius E., Debicq-Rychter M. Biallelic inactivation of NF1 in a sporadic plexiform neurofibroma. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2012; 51(9):852-857.
29. Consoli C., Moss C., Green S., Balderson D., Cooper D.N., Upadhyaya M. Gonosomal mosaicism for a nonsense mutation (R1947X) in the NF1 gene in segmental neurofibromatosis type 1. *Journal of investigative dermatology*. 2005;125(3):463-466.
30. Lai-Cheong J.E., McGrath J.A., Uitto J. Revertant mosaicism in skin: natural gene therapy. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(3):140-148.
31. Vandenbroucke I., van Doorn R., Callens T., Cobben J.M., Starink T.M., Messiaen L. Genetic and clinical mosaicism in a patient with neurofibromatosis type 1. *Human genetics*. 2004;114(3):284-290.
32. Kaplan L., Foster R., Shen Y., Parry D.M., McMaster M.L., O'leary M.C., Gusella J.F. Monozygotic twins discordant for neurofibromatosis 1. *American journal of medical genetics Part A*. 2010;152(3):601-606.
33. Vogt J., Kohlhase J., Morlot S., Kluwe L., Mautner V.F., Cooper D.N., Kehrer-Sawatzki H. Monozygotic twins discordant for neurofibromatosis type 1 due to a postzygotic NF1 gene mutation. *Human mutation*. 2011; 32(6):E2134-2147.
34. Callum P., Messiaen L.M., Bower P.V., Skovby F., Iger J., Timshel S., Sims C.A., Falk R.E. Gonosomal mosaicism for an NF1 deletion in a sperm donor: evidence of the need for coordinated, long-term communication of health information among relevant parties. *Human reproduction*. 2012; 27(4):1223-1226.
2. Cali F., Chiavetta V., Ruggeri G., Piccione M., Selicorni A., Palazzo D., Bonsignore M., Cereda A., Elia M., Failla P., Figura M.G. Mutation spectrum of NF1 gene in Italian patients with neurofibromatosis type 1 using Ion Torrent PGM™ platform. *European journal of medical genetics*. 2017 Feb 28;60(2):93-9.
3. Kresak J.L., Walsh M. Neurofibromatosis: a review of NF1, NF2, and schwannomatosis. *Journal of pediatric genetics*. 2016 Jun;5(02):098-104.
4. Rad E., Tee A.R. Neurofibromatosis type 1: Fundamental insights into cell signalling and cancer. In *Seminars in cell & developmental biology* 2016 Apr 1 (Vol. 52, pp. 39-46). Academic Press.
5. Shnayder N.A., Shapovalova E.A. Neurofibromatoz 1-go tipa (bolezn' Recklingkhauzena) [Neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen's disease)]. *Voprosy Prakticheskoi Pediatrii* [Questions of practical pediatrics]. 2011;6(1):83-8. (In Russ.)
6. Supek F., Lehner B. Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome. *Nature*. 2015 May;521(7550):81.
7. Valero M.C., Martín Y., Hernández-Imaz E., Hernández A.M., Meleán G., Valero A.M., Rodríguez-Álvarez F.J., Tellería D., Hernández-Chico C. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2011 Mar 1;13(2):113-22.
8. Xu W., Yang X., Hu X., Li S. Fifty-four novel mutations in the NF1 gene and integrated analyses of the mutations that modulate splicing. *International journal of molecular medicine*. 2014 Jul 1;34(1):53-60.
9. Pashchenko M.S., Karandasheva K.O., Kuznetsova E.B., Anisimova I.V., Bessonova L.A., Galkina V.A., Guseva D.M., Demina N.A., Makienko O.N., Markova T.V., Matyushchenko G.N., Petuhova M.S., Semenova M.A., Tanas A.S., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Molekulyarno-geneticheskiy analiz 617 rossiyskikh patsiyentov s klinicheskim diaгнозом «neurofibromatoz»: novyye patogennyye i redkiye nepatogennyye geneticheskiye variant [Genetic analysis of 617 Russian neurofibromatosis patients: novel pathogenic and rare non-pathogenic mutations]. *Medicinskaya genetika* [Medical Genetics]. 2018;17(11):20-24. (In Russ.)
10. Ferner R.E., Huson S.M., Thomas N., Moss C., Willshaw H., Evans D.G., Upadhyaya M., Towers R., Gleeson M., Steiger C., Kirby A. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *Journal of medical genetics*. 2007 Feb 1;44(2):81-8.
11. Spatola M., Wider C., Kuntzer T., Croquelois A. PTPN11 mutation manifesting as LEOPARD syndrome associated with hypertrophic plexi and neuropathic pain. *BMC neurology*. 2015 Dec;15(1):55.
12. Duarte M.L., Santos L.R., Duarte E.R., Abreu F.P., Ferreira J.B. Proteus Syndrome-A Rare Disease. *Int J Radiol Radiat Ther*. 2017;4(5):00113.
13. Ol'shanskaya A.S., Dyuzhakova A.V., Artyukhov I.P., Shnayder N.A., Dmitrenko D.V., Karacheva Y.V. Neurofibromatoz 1-tipa ili gigantskiy melanotsitarnyy nevus: problemy diagnostiki [Neurofibromatosis type 1 or giant melanocytic nevus: problems of diagnostic]. *Russkij Zhurnal Detskoy Nevrologii* [Russian Journal of Pediatric Neurology]. 2017 Jan 1;12(2):57-60. (In Russ.)
14. Philpott C., Tovell H., Frayling I.M., Cooper D.N., Upadhyaya M. The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Human genomics*. 2017 Dec;11(1):13.
15. Pasmant E., Parfait B., Luscan A., Goussard P., Briand-Suleau A., Laurendeau I., Fouveaut C., Leroy C., Montadert A., Wolkenstein P., Vidaud M. Neurofibromatosis type 1 molecular diagnosis: what can NGS do for you when you have a large gene with loss of function mutations?. *European Journal of Human Genetics*. 2015 May;23(5):596.
16. Qin L., Wang J., Tian X., Yu H., Truong C., Mitchell J.J., Wierenga K.J., Craigen W.J., Zhang V.W., Wong L.J. Detection and quantification of mosaic mutations in disease genes by next-generation sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2016 May 1;18(3):446-53.

References

1. Gutmann D.H., Ferner R.E., Listerick R.H., Korf B.R., Wolters P.L., Johnson K.J. Neurofibromatosis type 1. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017 Feb 23;3:17004.

17. Biesecker L.G., Spinner N.B. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2013 May;14(5):307.
 18. Chu C.H., Chou T.C., Liu C.I., Hsu C.S., Chan J.Y., Ou C.L. Multiple segmental neurofibromatosis: Report of two cases with different presentations. *Hong Kong Journal of Dermatology & Venereology*. 2016 Mar 1;24(1):34-9.
 19. García-Romero M.T., Parkin P., Lara-Corrales I. Mosaic neurofibromatosis type 1: a systematic review. *Pediatric dermatology*. 2016 Jan;33(1):9-17.
 20. Tinschert S., Naumann I., Stegmann E., Buske A., Kaufmann D., Thiel G., Jenne D.E. Segmental neurofibromatosis is caused by somatic mutation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene. *European Journal of Human Genetics*. 2000 Jun;8(6):455.
 21. GajECKa M. Unrevealed mosaicism in the next-generation sequencing era. *Molecular Genetics and Genomics*. 2016 Apr 1;291(2):513-30.
 22. Chaplygina M.S., Kuznetsova E.B., Tanas A.S., Bessonova L.A., Matyushchenko G.N., Galkina V.A., Petukhova M.S., Anisimova I.V., Demina N.A., Zaletaev D.V., Strel'nikov V.V. Rezul'taty ispol'zovaniya novoy meditsinskoy tekhnologii kompleksnoy DNK-diagnosticski neyrofibromatoza [The results of the use of the new medical technology for comprehensive DNA analysis in neurofibromatosis]. *Medicinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2016;15(11):24-28. (In Russ.)
 23. Karandasheva K.O., Anoshkin K.I., Volodin I.V., Kuznetsova E.B., Zaletaev D.V., Strel'nikov V.V., Tanas A.S. Isklyucheniye neverno kartirovannykh prochteniy pri targetnom vysokoproizvoditel'nom sekvenirovani DNK s ispol'zovaniyem tekhnologii Ion AmpliSeq [Elimination of incorrectly mapped reads from the results of Ion AmpliSeq targeted NGS]. *Medicinskaya genetika. [Medical Genetics]*. 2018;17(5):19-22. (In Russ.)
 24. <http://www.epigenetic.ru/projects/seqbase>
 25. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B., Kononov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., Afanasyev A.A., Zaklyazminskaya E.V., Kostareva A.A., Pavlov A.E., Golubenko M.V., Polyakov A.V., Kutsev S.I. Rukovodstvo po interpretacii dannyh, poluchennyh metodami massovogo parallel'nogo sekvenirovaniya (MPS). [Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants.] *Medicinskaya genetika. [Medical Genetics]* 2017 (7): 4-17 (In Russ)
 26. Ruggieri M., Huson S.M. The clinical and diagnostic implications of mosaicism in the neurofibromatoses. *Neurology*. 2001; 56(11):1433-1443.
 27. Upadhyaya M., Cooper D.N., editors. *Neurofibromatosis type 1: molecular and cellular biology* (p. 153). Springer Science & Business Media; 2013 Jan 29.
 28. Beert E., Brems H., Renard M., Ferreiro J.F., Melotte C., Thoelen R., De Wever I., Sciot R., Legius E., Debicq-Rychter M. Biallelic inactivation of NF1 in a sporadic plexiform neurofibroma. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2012; 51(9):852-857.
 29. Consoli C., Moss C., Green S., Balderson D., Cooper D.N., Upadhyaya M. Gonosomal mosaicism for a nonsense mutation (R1947X) in the NF1 gene in segmental neurofibromatosis type 1. *Journal of investigative dermatology*. 2005;125(3):463-466.
 30. Lai-Cheong J.E., McGrath J.A., Uitto J. Revertant mosaicism in skin: natural gene therapy. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(3):140-148.
 31. Vandenbroucke I., van Doorn R., Callens T., Cobben J.M., Starink T.M., Messiaen L. Genetic and clinical mosaicism in a patient with neurofibromatosis type 1. *Human genetics*. 2004;114(3):284-290.
 32. Kaplan L., Foster R., Shen Y., Parry D.M., McMaster M.L., O'leary M.C., Gusella J.F. Monozygotic twins discordant for neurofibromatosis 1. *American journal of medical genetics Part A*. 2010;152(3):601-606.
 33. Vogt J., Kohlhase J., Morlot S., Kluwe L., Mautner V.F., Cooper D.N., Kehrer-Sawatzki H. Monozygotic twins discordant for neurofibromatosis type 1 due to a postzygotic NF1 gene mutation. *Human mutation*. 2011; 32(6):E2134-2147.
- Callum P., Messiaen L.M., Bower P.V., Skovby F., Iger J., Timshel S., Sims C.A., Falk R.E. Gonosomal mosaicism for an NF1 deletion in a sperm donor: evidence of the need for coordinated, long-term communication of health information among relevant parties. *Human reproduction*. 2012; 27(4):1223-1226.