



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2023, 10 (1): 21-25

Nörofibromatozis Tip1’li Olgularda *NF1* Geni Varyant Spektrumu: Tek Merkez Deneyimi

NF1 Gene Variant Spectrum with Neurofibromatosis Type 1 patients: Single Center Experience

Hamide Betül Gerik-Çelebi ^{1*}, Hilmi Bolat², İpek Dokurel-Çetin³, Meliha Demiral⁴, Fethi Sırrı Çam⁵,

¹Tıbbi Genetik Kliniği, Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi, Balıkesir, Türkiye
²Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Balıkesir, Türkiye
³Çocuk Nöroloji Kliniği, Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi, Balıkesir, Türkiye
⁴Çocuk Endokrinoloji Kliniği, Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi, Balıkesir, Türkiye
⁵Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Manisa, Türkiye

e-mail: drbetulgerik07@gmail.com, hilmi_bolat@hotmail.com, balikesircocuknorooloji@gmail.com,
drmelihad@hotmail.com, sirricam@gmail.com

ORCID Numarası: 0000-0001-5218-7880

ORCID Numarası: 0000-0001-6574-8149

ORCID Numarası: 0000-0002-1820-8980

ORCID Numarası: 0000-0002-0535-4954

ORCID Numarası: 0000-0002-0972-8896

*Sorumlu yazar: Hamide Betül Gerik-Çelebi

Gönderim Tarihi / Received:12.08.2022

Kabul Tarihi / Accepted: 23.03.2023

DOI: 10.34087/cbusbed.1161317

Öz

Giriş ve Amaç: Nörofibromatozis tip 1 başlıca café au lait lekeleri, Lisch nodülleri ve nörofibromlarla karakterize otozomal dominant kalıtmımlı bir rasopatidir. Bu çalışmada amacımız, *NF1* ön tanısıyla başvuran hastaların genotipik verilerini sunmaktır.

Gereç ve Yöntemler: 2018 Haziran–2022 Haziran tarihleri arasında yaş ortalaması 8,1 yaş (2 ay-28 yaş aralığında) olan 22 olgu *NF1* ön tanısıyla değerlendirildi. Hastalara *NF1* geni dizi analizi yapıldı.

Bulgular: *NF1* geni dizi analizi yöntemiyle tanı oranı %90,9 idi. 16 farklı *NF1* geni varyantından 13 (%81,25) ü patojenik/muhtemel patojenik iken, 3 (%18,75)ü ise klinik önemi bilinmeyen varyantlardı.

Sonuç: *NF1* ön tanısıyla başvuran hastalardaki genetik tanı oranı ve klinik bulguları literatür verileri eşliğinde tartışıldı. 4 yeni *NF1* geni varyantı saptandı.

Anahtar kelimeler: Nörofibromatozis tip 1, Yeni nesil DNA dizileme, *NF1* geni, Yeni varyantlar

Abstract

Objective: Neurofibromatosis type 1 is an autosomal dominant inherited rasopathy mainly characterized by café au lait macules, Lisch nodules and neurofibromas. In this study, our aim is to present the genotypic data of patients evaluated with a pre-diagnosis of *NF1*.

Materials and Methods: Between June 2018 and June 2022, 22 cases with a mean age of 8.1 years (range 2 months to 28 years) were evaluated with a pre-diagnosis of *NF1*. *NF1* gene sequence analysis was performed on the patients.

Results: The diagnosis rate was 90.9% by *NF1* gene sequence analysis. Out of a total of 16 *NF1* gene variations, 13 (81,25%) were pathogenic/likely pathogenic, while 3 (18,75%) were variants of uncertain significance.

Conclusion: The rate of genetic diagnosis and clinical findings in patients presenting with a pre-diagnosis of *NF1* were discussed in the light of literature data. 4 novel *NF1* gene variants were identified.

Keywords: Neurofibromatosis type 1, Next generation DNA sequencing, *NF1* gene, Novel variants.

1. Giriş

Nörofibromatozis 1 (NF1 [OMIM no: 162200]) multipl cafe au lait makülleri (CALMs), multipl kutanöz nörofibromlar, axiller/inguinal çillenme, pleksiform nörofibrom ve iriste Lisch nodülü ile karakterize bir nörokutanöz hastalıktır. 17q11.2 kromozom bölgesinde bulunan nörofibromin 1 (NF1 [OMIM no: 613113]) genindeki mutasyonlar sonucu görülür. Prevelansı yaklaşık olarak 1/3000 olarak bildirilmektedir [1]. Öğrenme güçlüğü, plexiform nörofibrom, optik sinir ve diğer santral sinir sistemi gliomaları, malign periferik sinir kılıfı tümörleri, skolyoz, tibial displazi ve vaskülopatiler ise eşlik edebilen diğer klinik bulgulardır [2]. Hastalığın sık görülen bulgularını içeren Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) NF1 tanı kriterlerine göre klinik tanı almaktadır [3].

Bu çalışma ile NF1 ön tanısı ile başvuran hastaların moleküler genetik sonuçlarının klinik bulguları eşliğinde değerlendirilmesi ve ebeveynlerin taşıyıcılığını belirlemek amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1 Örneklem

Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik polikliniğine 01/06/2018 – 01/06/2022 tarihleri arasında yaş aralığı ve cinsiyet farkı gözetmeksizin NF1 ön-tanısı ile başvuran hastaların NF1 geni dizi analizi çalışmaya dahil edilecektir. Bilgi işlem merkezinden alınan bilgiler anonim hale getirilerek analiz edilecektir.

Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) NF1 tanı kriterleri arasında bulunan CALMs, aksiller/inguinal çillenme, nörofibromlar, optik gliom ve iki ya da daha fazla Lisch nodülleri bulgularından herhangi birine sahip olan tüm olguların demografik verileri, başvuru bulguları, NF1 geni dizi analizi sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Bu retrospektif çalışmamıza Nörofibromatozis Tip 2, Noonan Sendromu gibi diğer rasopatiler dahil edilmedi.

2.2 Araştırma izni

Bu çalışma için Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığından etik kurul onamı alınmıştır (2022/49-30/03/2022)

2.3 Genetik Analiz

2.3.1 NF1 geni dizi analizi

Hastalardan 2 ml periferik venöz kan EDTA'lı tüpe alındı. Periferik venöz kan örneklerinden genomik DNA (gDNA), QIAamp Blood&Tissue kit protokolüne (Qiagen, Hilden, Almanya) göre izole edildi. NF1 geni ekzon-intron bağlantı bölgeleriyle birlikte tüm kodlama ekzonları, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Tüm kodlayan bölgeler ve ekzon-intron bölgelerini içeren NF1 geni dizi analizi MiSeq platformu (Illumina, San Diego, California, United States) kullanılarak yapıldı.

2.3.2 Yeni nesil DNA dizileme verilerinin analizi

Klinik özelliklerle ilişkili patojenik varyantlar sırasıyla ilerleyen adımlara göre filtrelendi: 1) tüm yanlış anlamlı, anlamsız, çerçeve kayması, çerçeve ve sinonim varyantlar, 2) popülasyon çalışmalarında minör allel

frekansı <%1,0 olan varyantlar [1000 Genom (1000G), ESP, ExAC ve Genom Toplama Veritabanı (gnomAD)]. HGMD® ve ClinVar (<http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) veritabanlarındaki yeni varyantlar kontrol edildi. Yeni varyantların Amerika Tıbbi Genetik ve Genomik Topluluğu (American College of Medical Genetics and Genomics; ACMG) kriterlerine göre patojenite skorlaması yapıldı [4].

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Bulgular

Yaş ortalaması 8,1 yaş (2 ay-28 yaş aralığında) olan 22 hasta (17 farklı aile) bu çalışmaya dahil edildi. Hastaların 10 (%45,5) tanesi erkek, 12 (%54,5) tanesi kadındı. Aralarında akrabalık bulunmayan 3 farklı aileden ikişer kardeş vardı. En sık başvuru bulgusu, hastaların tümünde ortak olarak görülen, multipl cafe au lait makülleri idi. NF1 ön tanılı hastalardaki genetik yatkınlığı retrospektif olarak değerlendirdiğimiz bu çalışmamızda %90,9 (20/22) oranında NF1 geni varyantı saptanmıştır. Patojenik (n=10) ve olası patojenik (n=3) varyantlar %81,25 (n=13) di. Toplam 5 olguda (2 farklı akraba olmayan aileden ikişer farklı kardeş+1 diğer olgu) ise %18,75 (n=3) oranında klinik önemi bilinmeyen değişim tespit edildi. Varyant saptanan olguların demografik, genetik ve klinik verileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

3.2 Tartışma

Multisistemik tutulum gösteren hastalıklarda genotip-fenotip korelasyonunu sağlamak zordur. Bu nedenle bilinen genetik varyantlarla ilişkili klinik bilgilerin artması ve yeni genetik varyantların saptanması önem taşımaktadır. Yeni nesil DNA dizileme yöntemleri, saptanan genetik varyantların artmasını sağlamıştır. Bu çalışmada NF1 geni dizi analizi yöntemiyle 5'i yeni olmak üzere toplam 16 farklı NF1 gen varyantı saptadık. Bu varyantların 4 tanesi (c.760dup, c.1255_1260del, c.1326dup, c.2698del) daha önce herhangi bir veri tabanında bildirilmemiş novel varyantlardır.

Çalışmamızda saptanan 16 farklı varyanttan 6'sı çerçeve kayması (frameshift), 5'i yanlış anlamlı (missense), 4'i stop kodon oluşturan (nonsense), 1'i ise çerçeve içi (in-frame) mutasyon idi. Bizim çalışmamızda en sık çerçeve kayması (frameshift) mutasyonlar gözlenirken, önceki çalışmalarda en sık missense mutasyonlar bildirilmiştir [5].

NF1 hastalarında zihinsel yetersizlik, öğrenme güçlükleri, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu ve diğer psikiyatrik eş tanılar genel popülasyona göre daha sık görülmektedir. Beyinde nörofibromin ekspresyonundaki değişikliğin bilişsel bozulmaya sebep olduğu öne sürülmüştür [6,7]. Gresham ve arkadaşlarının çalışmasında, 152 NF1 olgusunun %75'inde öğrenme güçlüğü rapor edilmiştir [8]. Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada ise NF1 olgularının %21'inde nörogelişimsel bozukluklar saptanmış ve hastalar pediatrik nöroloji ve psikiyatri tarafından takibe alınmıştır [9]. Bizim çalışmamızda ise NF1 geni varyantı saptadığımız olguların %30'unda (n=6) nörogelişimsel bozukluk mevcuttu.

Tablo 1. *NF1* geni varyantı saptanan tüm olguların demografik, genetik ve klinik verileri

Has ta	Yaş	Cinsi yet	Varyant	Mutasyon türü	Lokasyo nu	ACMG sınıflamas ı	Klinik bulgular	Aile öykü sü
1	8	K	c.581T>G (p.Leu194Arg)	missense	Ekzon 5	Patojenik	CALMs, Lisch nodülü	na
2	1	K	c.760dup (p.Asp254Gly fsTer5)	frameshift	Ekzon 8	Olası Patojenik (PVS1, PM2)	CALMs	M
3	7	E	c.910C>T (p.Arg304Ter)	nonsense	Ekzon 9	Patojenik	CALMs, makrosefali, nörogelişimsel bozukluk	M
4	15	K					CALMs, Lisch nodülü, nörogelişimsel bozukluk	
5	23	E	c.1255_1260del (p.Thr419_ Asn420del)	inframe mutation	Ekzon 11	Klinik önemi bilinmeyen değişim (PM2, PM4)	CALMs, beyinde hamartomatöz lezyon	na
6	1,5	E	c.1326dup (p.Phe443Val fsTer3)	frameshift	Ekzon 12	Olası patojenik (PVS1, PM2)	CALMs, nörogelişimsel bozukluk, akut lösemi	De-nova
7	1	K	c.2033dup (p.Ile679Asp fsTer21)	frameshift	Ekzon 18	Patojenik	CALMs, büyümede yetersizlik	De-nova
8	15	K	c.2509T>G (p.Trp837Gly)	missense	Ekzon 21	Patojenik	CALMs, nörofibrom, dismorfik yüz bulguları, nörogelişimsel bozukluk	De-nova
9	8	E	c.2698del (p.Ser900Pro fsTer2)	frameshift	Ekzon 21	Olası patojenik (PVS1, PM2)	CALMs, skolyoz, beyinde hamartomatöz lezyon	na
10	2 aylık	K	c.3143G>A (p.Trp1048Ter)	nonsense	Ekzon 24	Patojenik	CALMs	De-nova
11	3	K	c.3447G>A (p.Met1149Ile)	missense	Ekzon 26	Patojenik	CALMs, kısa boy, büyümede yetersizlik	na
12	28	K	c.3457_3460del (p.Leu1153Met fsTer4)	frameshift	Ekzon 26	Patojenik	CALMs	na
13	4	E	c.3721C>T (p.Arg1241Ter)	nonsense	Ekzon 28	Patojenik	CALMs, sağ talamik ve bilateral dentat nukleusta hamartom, kısa boy, nörogelişimsel bozukluk	na
14	14 yaş	K	c.3976T>A (p.Leu1326Ile)	missense	Ekzon 30	Klinik önemi	CALMs, kısa boy, dismorfik yüz bulguları	P

15	14 yaş	K				bilinmeyen değişim	CALMs	
16	10 yaş	K	c.4430G>C (p.Arg1477Thr)	missense	Ekzon 32	Klinik önemi bilinmeyen değişim	CALMs, axiller çillenme, büyümede yetersizlik	P
17	8 yaş	E					CALMs	
18	4 yaş	E	c.5839C>T (p.Arg1947Thr)	nonsense	Ekzon 39	Patojenik	CALMs, sol axiller çillenme	P
19	3 ay	E	c.5839C>T (p.Arg1947Thr)	nonsense	Ekzon 39	Patojenik	CALMs, bilateral pyelektazi	M
20	4 yaş	E	c.7442del (p.Gly2481AspfsTer21)	frameshift	Ekzon 50	Patojenik	CALMs, büyümede yetersizlik, nörogelişimsel bozukluk	De-nova

feokromositoma ve çocukluk çağı lenfositik lösemi

E: Erkek, K: Kadın, CALMs: Multipl cafe au lait makülleri, M: Maternal kalıtlı/Anne geçişli, P: Paternal kalıtlı/Baba geçişli, na: tespit edilemedi*Tüm varyantlar *NF1* geni NM_000267.3 transkriptine göre adlandırılmıştır. Novel varyantlar koyu renkle gösterilmiştir. (3-4, 14-15, 16-17 no'lu hastalar aralarında akrabalık bulunmayan farklı ailelerden kardeş bireylerdir.)

Bu olguların 3'ü çerçeve kayması, 2'si stop kodon ve 1'i missense mutasyon taşımaktaydı. Ayrıca, çerçeve kayması mutasyonlarının gelişimsel gerilik, zihinsel yetersizlik ya da öğrenme güçlükleri ile diğer mutasyon çeşitlerine göre daha fazla ilişkili olabileceği de vurgulanmıştır [10]. Bizim çalışmamızın bulguları da bu ilişkiyi desteklemekteydi. *NF1* vakalarının %50'sinde aile öyküsü varken %50'si de-nova'dır. Bizim çalışmamızda literatürle benzer şekilde ailesel segregasyon çalışması yapılan 11 farklı aileden 6'inde (%54,5) uni-parental kalıtım saptanırken, 5 (%45,5) tanesinin de-novo olduğu görüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda da de-novo olduğu saptanan mutasyonlar tüm olguların %50'sini oluşturmaktadır [11, 12]. Abdel-Aziz ve arkadaşlarının yaptığı güncel bir çalışmada ise de-novo mutasyonlar için daha yüksek bir oran (%68) belirtilmiştir [5].

Cafe au lait makülleri *NF1*'de en sık görülen ve en erken dönemde ortaya çıkan bulgudur. Sayıları yaşla birlikte artar. Kutanöz nörofibromlar, Lisch nodülü, axiller ve inguinal çillenmeler ise genellikle ilerleyen yaşlarda görülmeye başlar [3]. *NF1* tanısı alan olguların yaş ortalaması 8,1 olan çalışmamızda literatürle uyumlu olarak en sık (%100), tüm hastalarda ortak başvuru sebebi, gördüğümüz bulgu multipl cafe au lait makülleri idi. Nörogelişimsel bozukluk (n=6), büyümede yetersizlik (n=4), nörofibrom/ hamartomatöz lezyonlar (n=4) ve kısa boy (n=3) *NF1* varyantı taşıyan hastalarımızın yaklaşık %15-30'unda gözlemlendiğimiz bulgulardandı.

Malign tümörler, *NF1* hastalarında sağlıklı popülasyona göre 4 kat daha sık görülmektedir [9]. Düşük dereceli gliomalar, nörofibrosarkom,

sıklığı artmıştır [12, 13, 14]. Bizim hastalarımızın yaş ortalaması oldukça genç olmasına rağmen 1.5 yaş olan bir olguda, hasta 6, tanı sürecinde B-hücreli akut lenfoblastik lösemi geliştiği öğrenildi. Ek olarak, multipl cafe au lait makülleri, gelişme geriliği ve akut lösemisi olan bu olguda yapılan *NF1* dizi analizi sonucunda literatürde daha önce bildirilmemiş bir mutasyon olan çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu c.1326dup (p.Phe443ValfsTer3) saptadık.

4. Sonuç

Sonuç olarak; *NF1* klinik tanı alsada, yüksek bir mutasyon tespit oranına sahip *NF1* geninin moleküler genetik analizi ile faydalı bir tanı yaklaşımı sunulmuştur. Bu nedenle, *NF1*'de yeterli genotip-fenotip analizi, daha iyi klinik yönetim ve uygun genetik danışmanlık için, ortaya çıkan komplikasyonların erken teşhisini ve semptomatik tedavisini amaçlayan klinik belirtilerin yaşa bağlı olarak izlendiği, uzunlamasına, hasta merkezli bir modele ihtiyaç duyulmaktadır.

Referanslar

1. Stella, A, Lastella, P, et al., Clinical presentation and genetic analyses of neurofibromatosis type 1 in independent patients with monoallelic double de novo closely spaced mutations in the *NF1* gene, *Human Mutation*, 2022.
2. Üstün, C, Arslan, M, Nörofibromatozis Tip 1 Tanısı ile İzlenen Hastaların Klinik Özellikleri: Tek Merkez Deneyimi, *Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi*, 2022, 1-5.
3. Legius E, Messiaen L, et al., International Consensus Group on Neurofibromatosis Diagnostic Criteria (I-NF-DC), Huson SM, Evans DG, Plotkin SR. Revised diagnostic criteria for neurofibromatosis type 1 and Legius syndrome: an international consensus recommendation. *Genetics in Medicine*, 2021, 23(8), 1506-1513.

4. Richards, S, Aziz, N, 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, *Genetics in Medicine*, 2015, 17(5), 405–423.
5. Abdel-Aziz, N.Y, El-Kamah, G, et al., Mutational spectrum of NF1 gene in 24 unrelated Egyptian families with neurofibromatosis type 1. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2021, 9(12), e1631.
6. Torres N, Velez, M.M, Van Meerbeke, A, et al., Cognitive and Behavioral Disorders in Children with Neurofibromatosis Type 1, *Frontiers in Pediatrics*, 2017, 5, 227.
7. Acosta, M.T, Bearden C.E, et al., The learning disabilities network (LeaDNet): using neurofibromatosis type 1 (NF1) as a paradigm for translational research, *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 2012, 158A, 2225-2232.
8. Gresham, F.M, MacMillan, D.L, Bocian, K.M, Learning disabilities, low achievement, and mild mental retardation: more a like than different? *Journal of Learning Disabilities*, 1996, 29(6), 570–581.
9. Gonca Kaçar, A, Kılınc Oktay, B, et al., Neurofibromatosis Type 1 in Children: A Single-Center Experience, *Turkish Archives Pediatrics*, 2021, 56(4), 339-343.
10. Napolitano, F, Dell'Aquila, M, et al, Genotype-Phenotype Correlations in Neurofibromatosis Type 1: Identification of Novel and Recurrent NF1 Gene Variants and Correlations with Neurocognitive Phenotype, *Genes (Basel)*, 2022, 13(7), 1130.
11. Valero, M.C, Martin, Y, et al, A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2011, 13(2), 113–122.
12. Peltonen, S, Kallionpää, R.A, et al. Pediatric malignancies in neurofibromatosis type 1: a population-based cohort study, *International Journal of Cancer*. 2019, 145, 2926-2932.
13. Anderson, J.L, Gutmann, D.H, Neurofibromatosis type 1, *Handbook of clinical neurology*, 2015, 132, 75–86.
14. Ly, K.I, Blakeley, J.O, The Diagnosis and Management of Neurofibromatosis Type 1, *The Medical Clinics of North America*, 2019, 103(6), 1035–1054.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Alıntı-Gayriticari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır

