Original Article

Analysis of mutable exons of neurofibromatosis Type 1 (NF1) gene in Iranian patients

Farhadi-Shaheni N[1], Baghbani-Arani F[1*], Mahdavi-Ourtakand M[2]

1- Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, I.R. Iran.
2- Department of Biology, Faculty of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, I.R. Iran.

Received: 2022/06/26 | Accepted: 2023/05/13

Abstract:

Background: Neurofibromatosis Type 1 (NF1) is an autosomal dominant disease caused by mutations in a tumor suppressor protein called neurofibromin. The NF1 gene consists of 60 exons and due to the large size of the NF1 gene, variation in mutations and the absence of mutation hotspots is a complex problem in genetic counselling. Considering that determining the frequency of mutations in a population contributes to effective genetic counseling and prevention of more diseases. So, this study aimed to identify the underlying genetic defect in 10 Iranian patients with neurofibromatosis type 1.
Materials and Methods: After collecting blood from patients and genomic DNA extraction, 9 high mutability exons were analyzed by PCR and sequencing methods. Finally, sequenced exons and reference exons were compared using the bioinformatic tools, and mutations were identified.
Results: Among 10 evaluated patients six different mutations were detected. These mutations included two deletions (c.1458-1459 delAA, c.1541-1542 delAG in 13 & 14 exons, respectively), and four substitution mutations. The c.5172 G>A, c.3871-2 A>G, and c.3867 C>T mutations were reported for the first time in this study.
Conclusions: The results of this study implied that there are various mutations in this disease and the most reliable method for NF1 mutation analysis is DNA sequencing.

Keywords: Neurofibromatosis Type 1, Common mutation, DNA sequencing, Mutability exons

***Corresponding Author**
Email: baghbani.f@gmail.com
Tel: 0098 213 672 5011
Fax: 0098 213 672 5011

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2023; Vol. 27, No 2, Pages 197-201

Please cite this article as: Farhadi-Shaheni N, Baghbani-Arani F, Mahdavi-Ourtakand M. Analysis of mutable exons of neurofibromatosis Type 1 (NF1) gene in Iranian patients ***Feyz*** 2023; 27(2): 197-201.

بررسی اگزون‌های جهش‌پذیر ژن بیماری نوروفیبروماتوز تیپ I (NF1) در بیماران ایرانی

نفیسه فرهادی شهنی [۱]، فهیمه باغبانی آرانی [۱*]، معصومه مهدوی اورتاکند [۲]

خلاصه:

سابقه و هدف: نوروفیبروماتوز نوع ۱ (NF1) نوعی بیماری ژنتیکی اتوزوم غالب است که به‌دلیل جهش در ژن سرکوبگر تومور نوروفیبرومین ۱ (NF1) رخ می‌دهد. این ژن ۶۰ اگزون داشته و به‌دلیل اندازه بزرگ ژن، تنوع انواع جهش‌های شناخته‌شده و نبود نقاط داغ جهش، تشخیص ژنتیکی بیماری معضل بزرگی در مشاوره ژنتیک می‌باشد. از طرفی تعیین نرخ فراوانی جهش‌ها در یک جمعیت به مشاوره ژنتیک مؤثر و جلوگیری از بروز بیشتر بیماری کمک می‌کند؛ لذا این مطالعه با هدف شناسایی نقص ژنتیکی زمینه‌ای در ۱۰ بیمار ایرانی مبتلا به NF1 انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: پس از خونگیری و استخراج DNA ژنومی، ۹ اگزون با بیشترین نرخ جهش در ژن NF1، با استفاده از تکنیک PCR تکثیر و توالی‌یابی شد. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی جهش‌های موجود شناسایی گردید.

نتایج: در میان ۱۰ بیمار موردمطالعه، ۶ مورد دارای جهش در اگزون‌های موردبررسی بودند؛ به‌طوری‌که در اگزون ۱۳ و ۱۴ جهش حذف مشاهده گردید (به‌ترتیب c.1458-1459 delAA و c.1541-1542 del AG) و ۴ جهش دیگر از نوع جایگزینی بودند. جهش‌های c.5172 G>A در اگزون ۳۷، c.3871-2 A>G در اگزون ۲۹ و c.3867 C>T در اگزون ۲۸ به‌عنوان جهش جدید معرفی گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق تأیید می‌کند که جهش‌های متنوع و پراکنده‌ای در این بیماری وجود دارد و درنتیجه همچنان مطمئن‌ترین روش بررسی، روش تعیین توالی DNA می‌باشد.

واژگان کلیدی: نوروفیبروماتوز نوع ۱، جهش‌های شایع، توالی‌یابی DNA، اگزون‌های جهش‌پذیر

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲، صفحات ۲۰۱-۱۹۷

مقدمه

NF1، یکی از شایع‌ترین بیماری‌های اختلال اتوزوم غالب است که تقریباً فراوانی آن ۱ در هر ۳۵۰۰ نوزاد زنده می‌باشد [۱]. این بیماری به‌واسطه نقص در یک ژن غالب ایجاد شده و باعث ایجاد تومورهایی با منشاء نورواکتودرمال و مزودرمی می‌شود. علائم ظاهری بیماری شامل ظاهرشدن رنگ شیر قهوه‌ای (CALs)، کک و مک روی پستان و یا زیر بغل، نوروفیبروم‌های پوستی، گره‌های لیش در عدسی چشم، گلیومای نوری و اختلالات خاص استخوانی است و گاهی خطر ابتلا به تومورهای بدخیم در این بیماران افزایش می‌یابد [۵-۲]. ژن مسؤول نوروفیبروماتوز نوع ۱ روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد و پروتئینی به نام نوروفیبرومین را کد می‌کند که نوعی تنظیم‌کننده منفی تکثیر و تمایز سلولی است.

۱. گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

* نشانی نویسنده مسؤول:

گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا، ایران

تلفن: ۰۲۱۳۶۷۲۵۰۱۱ دورنویس: ۰۲۱۳۶۷۲۵۰۱۱

پست الکترونیک: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۵ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۲/۲۳

ژن NF1 با طول حدود ۲۸۰ kb در موقعیت 17.q11.2 قرار گرفته است و از ۵۷ اگزون اصلی و حداقل ۳ اگزون تناوبی 23 a، br9 و 48 a تشکیل شده است. شایع‌ترین رونوشت برای نوروفیبرومین، یک پلی‌پپتید ۲۸۱۸ آمینواسیدی است. در این توالی بلند آمینواسیدی احتمال بالای جهش خودبخودی وجود دارد و تقریباً نیمی از موارد NF1 توسط جهش‌های جدید ایجاد می‌شوند [۹-۶]. تاکنون بیش از ۳۰۰۰ جهش مختلف از این ژن گزارش شده است و عموماً به علت بزرگی ژن، نبود نقاط داغ جهش و تنوع جهش‌ها، تشخیص مولکولی این بیماری با چالش همراه است [۱۱-۱۰]. در رابطه با وقوع جهش در ژن NF1 تحقیقاتی مختلفی صورت گرفته است اما Riva و همکاران (۲۰۲۲) در یک بررسی جامع نشان دادند که اگرچه انواع مختلفی از جهش‌ها در NF1 مشاهده می‌شود اما جهش جایگزینی C به T جزو شایع‌ترین مکانیسم‌های اختلال در این ژن است [۱۲]. همچنین نواحی مختلفی از ژن نیز وجود دارد که بیشتر تحت جهش قرار می‌گیرد؛ به‌طوری‌که Xu و همکاران نشان دادند که رخداد جهش در اگزون‌های ۱۳، ۲۸ و ۳۱ شایع‌تر از دیگر اگزون‌ها در جمعیت موردبررسی می‌باشد [۱۳]. Sabbagh و همکاران نیز در یک مطالعه جامع طیف وسیعی از جهش‌ها را در جمعیت فرانسه گزارش کردند؛ به‌طوری‌که برخی اگزون‌ها به‌صورت ترجیحی نرخ جهش بالاتری داشتند [۱۴]. در مطالعه‌ای که اخیراً در ایتالیا و روی جمعیت نسبتاً بزرگ بیماران NF1 (۸۵ بیمار) انجام

شد، درمجموع ۶۶ جهش مختلف مشاهده گردید که هفت جهش آن برای اولین‌بار گزارش شد و مشخص گردید که جهش در اگزون‌های ۲۸ و ۱۹ نسبتاً بیشتر است [۱۵]. اگرچه فوجی و همکاران در سال ۲۰۲۰ با مطالعه روی ۱۱ خانواده ایرانی توانستند انواع جهش‌های حذف، جهش اضافه‌شدن یک نوکلئوتید و جهش مقر پیرایش در ژن را گزارش کنند [۱۶] اما مطالعات تعیین جهش این بیماری در ایران بسیار محدود است و اغلب مطالعات انجام شده روی این بیماری در ایران مطالعات کلینیکی و گزارش‌های موردی نادر می‌باشد؛ بنابراین لازم است بررسی‌های ژنتیکی بیشتری در جمعیت ایرانی صورت پذیرد. تعیین جهش‌های شایع در یک جمعیت برای مشاوره ژنتیک و تشخیص پیش از تولد یک بیماری، نقطه عطفی در مدیریت تشخیص و درمان بیماری در یک جمعیت می‌باشد. لذا هدف مطالعه حاضر تعیین میزان و نوع جهش در اگزون‌های شایع جهش‌پذیر NF1 در جمعیت ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

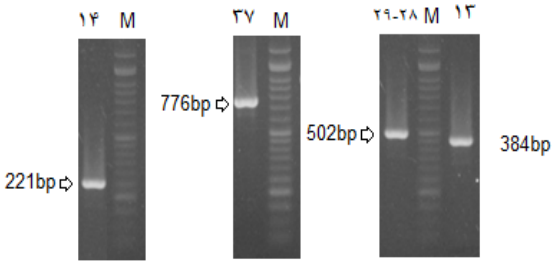
در این مطالعه توصیفی، ۱۰ بیمار مبتلا به NF1 مراجعه‌کننده به چند کلینیک مشاوره ژنتیک در تهران وارد مطالعه شدند. معیار ورود به مطالعه علایم بالینی و تأیید آن‌ها توسط پزشک متخصص بود. این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین با شناسه IR.IAU.VARAMIN.REC.1397.030 به تصویب رسید. از آن‌جایی که بیماران اغلب کودک بودند، لذا از والدین بیماران فرم رضایت‌نامه کتبی اخذ شد. سپس از هر یک از بیماران ۵ میلی‌لیتر خون وریدی گرفته شد و استخراج DNA با روش رسوب نمک (Salting out) DNA انجام شد و برای اندازه‌گیری مقدار، خلوص و غلظت DNA استخراج‌شده از روش اسپکتوفتومتری (با استفاده از دستگاه نانودراپ) استفاده گردید. ابتدا با استناد به مقالات گذشته، ۹ اگزون که بیشترین گزارش‌ها در مورد جهش آن‌ها وجود داشت به‌عنوان اگزون‌های شایع جهش‌پذیر (اگزون‌های ۵، ۱۳، ۱۴، ۲۸، ۲۹، ۳۱، ۳۷، ۵۳ و ۵۴) انتخاب گردید و قطعات اگزونی آنها با روش PCR تکثیر شدند. برای طراحی پرایمرها (جدول شماره ۱) از نرم‌افزار primer 3 استفاده گردید. سپس ویژگی‌های پرایمرهای طراحی‌شده از طریق نرم‌افزار Gene Runner مورد بررسی قرار گرفت. درنهایت اختصاصیت پرایمرها با استفاده از ابزار آنلاین Blast NCBI تأیید شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ µl برای هریک از نمونه‌ها صورت پذیرفت. در هر واکنش ۸ µl مسترمیکس PCR (سیناژن، ایران) با غلظت 2 X، ۰/۵ µl از هریک از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت 15 pmol/µl و ۱ µl از DNA استخراج‌شده با غلظت 40 ng/µl استفاده شد و قطعات اگزونی با برنامه دمایی دناتوراسیون اولیه (۹۵ درجه، ۵ دقیقه)، ۳۵ چرخه دمایی (۹۵، ۵۷ و ۷۲ درجه هریک ۴۰ ثانیه) و تکثیر نهایی ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر شدند و DNAهای سنتزشده با استفاده از روش الکتروفورز آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت و سپس اطمینان از صحت محصول توالی‌یابی، با روش سنگر و توسط شرکت کدون (ایران) انجام گردید. توالی به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار Chromas نسخه ۸ بررسی شد و نهایتاً توالی مربوط به اگزون‌های هریک از بیماران، با استفاده از نرم‌افزار آنلاین EMBOSS Water و روش pairwise alignment با توالی مرجع مقایسه شدند و جهش‌های موجود شناسایی گردیدند و موقعیت هر جهش در مولکول cDNA ثبت شد.

جدول شماره ۱- پرایمرهای مورداستفاده برای هر قطعه اگزونی

نام اگزون	توالی پرایمرها ´۳ →´۵	طول قطعه تکثیر شده
۵	P F: GATGTCTTGCTATGTTGCCCAGG P R: ATTGCCAAGATTTAAAATGCTCA	479 bp
۱۳	P F: AATACTGACCTTATGCTTACTATTGA P R: TATCCTCAAGGTCTTGGCGTTTC	384 bp
۱۴	P F: TTGAAGTTTCCTTTTTTTCCTTGCA P R: AAACCACACACCAAAGGAACATCAT	221 bp
۲۹-۲۸	P F: TTCCTACCTAAGAATAAAAATGGGA P R: AACAGCGGTTCTATGTGAAAAGAT	502 bp
۳۱	P F: TGTTGCTGTATGTAGTCGGTGCT P R: TTTACAGTGAAGGTCAAATAGGC	226 bp
۳۷	P F: TTCCCACTGTTTTCTTCCTTTC P R: GAGGCCAGGATATAGTCTAGTTAGTCA	776 bp
۵۴-۵۳	P F: GGTGAAGTGATTATCCAGGTGTT P R: TTAACTTAAAGACAGGCACGAAG	515 bp

نتایج

پس از انجام استخراج DNA و تأیید کیفیت و کمیت آن، قطعات اگزونی با موفقیت با روش PCR تکثیر شدند و کیفیت محصولات با روش الکتروفورز بررسی گردیدند (شکل شماره ۱). پس از تأیید صحت قطعات تکثیرشده، توالی‌یابی با روش سنگر انجام شد و نهایتاً توالی به‌دست‌آمده از هر اگزون، با توالی اگزون مرجع مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج بررسی ۱۰ بیمار نشان داد که ۶ بیمار در اگزون‌های موردبررسی، دارای جهش بودند. طبق جدول شماره ۲ دو بیمار ۴ و ۹ در اگزون ۲۸ و بیمار ۳ و ۶ به‌ترتیب در اگزون‌های ۳۷ و ۲۹ دارای جهش جایگزینی بودند. همچنین بیمار ۵ در اگزون ۱۴ دارای یک حذف دونوکلیوتیدی AG در موقعیت c.1541-1542 بود. بیمار ۸ نیز در اگزون ۱۳ دارای جهش c.1458-1459 delAA بود که نوعی حذف را نشان می‌دهد. طبق بررسی‌های انجام‌شده، همه جهش‌های مشاهده‌شده به جز جهش‌های c.1458.1459delAA و c.3826 C>T از نوع جهش جدید می‌باشند. ۴ بیمار نیز بدون جهش در اگزون‌های موردبررسی بودند.



شکل شماره ۱- الکتروفورز قطعات اگزونی ژن NF1 تکثیرشده با روش PCR: شماره‌ها نشان‌دهنده‌ی اگزون‌ها و M مارکر 50 bp می‌باشد. اندازه هر محصول PCR در عکس مشخص شده است.

جدول شماره ۲- جهش‌های شناسایی‌شده در بیماران مبتلا به NF1

کد بیمار	Ref Seq**	اگزون	جهش
بیمار ۳	NM-001042492.2	EXON 37	c.5172 G>A
بیمار ۴	NM-001042492.2	EXON 28	c.3826 C>T
بیمار ۵	NM-001042492.2	EXON 14	c.1541-1542 del AG
بیمار ۶	NM-001042492.2	EXON 29	c.3871-2 A>G
بیمار ۸	NM-001042492.2	EXON 13	c.1458-1459 delAA
بیمار ۹	NM-001042492.2	EXON 28	c.3867 C>T

**Reference Sequence

بحث

با توجه به فنوتیپ متغیر بیماری نوروفیبروماتوز در کودکان، آنالیز جهش در بیماران با علایم بالینی مشکوک به NF1 برای تأیید بیماری، مورد نیاز است. همین‌طور بررسی جهش‌ها در تشخیص پیش از تولد جهت جلوگیری از رخداد مجدد بیماری در خانواده‌ها، اهمیت دارند [۱۷]. از طرفی تعیین جهش بیماری‌زا در این بیماری با توجه به اندازه بزرگ ژن NF1، عدم وجود نقاط داغ جهش، طیف گسترده جهش‌های احتمالی و حضور ژن‌های کاذب، همواره با چالش همراه است. بنابراین در این تحقیق ۹ اگزون که در مطالعات قبلی [۱۶-۱۰] بیشترین نرخ جهش را داشتند انتخاب و در ۱۰ بیمار غیرمرتبط از نظر رخداد جهش با روش تعیین توالی DNA، مورد بررسی قرار گرفتند. به‌طور کلی نتایج مطالعه چهار جهش جایگزینی و دو جهش حذف را در این ۱۰ بیمار نشان داد که همه جهش‌ها از نوع جهش نقطه‌ای بودند و این یافته با نرخ بالای جهش نقطه‌ای گزارش‌شده در این ژن، مطابقت دارد. به‌طوری‌که طبق گزارش‌ها، اکثر جهش‌های NF1 (۸۵ تا ۹۰ درصد) از نوع جهش‌های کوچک مانند جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی، درج‌ها و یا حذف هستند. جهش‌های دیگر شامل حذف یک یا چند اگزون (تقریباً ۲ درصد) و حذف‌های کوچک هستند که NF1 و ژن‌های همسایه آن (تقریباً ۵ تا ۱۰ درصد) را دربرمی‌گیرد [۱۸،۱۶]. در مطالعه حاضر جهش‌های گزارش‌شده در اگزون‌های ۳۷،۱۴،۲۹ و جهش c.3867 C>T در اگزون ۲۸، جهش‌های جدید می‌باشند که برای اولین‌بار در این ژن گزارش می‌شود و طبیعتاً برای بررسی اثر فنوتیپی و تعیین بیماری‌زایی این جهش‌ها بررسی‌های بیشتری لازم می‌باشد. این در حالی است که جهش c.1458.1459delAA در اگزون ۱۳ قبلاً در یک بیمار ایرانی برای اولین‌بار گزارش شده است [۱۶]. مشاهده این جهش در بررسی حاضر مجدداً در یک فرد ایرانی می‌تواند قابل‌تأمل باشد؛ به‌طوری‌که در صورت تکرار این جهش در مطالعات بعدی می‌تواند احتمال وراثتی‌بودن این جهش و وجود یک جدّ مشترک در جمعیت ایرانی را تأیید کند. این حذف ژنتیکی در اگزون ۱۳ منجر به ایجاد کدون پایان زودهنگام و نتیجتاً تولید یک پروتئین کوتاه می‌شود و به نوعی جهش پاتوژنتیک می‌باشد. جهش c.3826 C>T در اگزون ۲۸ نیز قبلاً در چندین مطالعه گزارش شده است [۱۸،۱۶]؛ به‌طوری‌که یکی از گزارش‌های قبلی در یک بیمار ایرانی بوده است. تغییر نوکلیوتید C به T در موقعیت ۳۸۲۶ c.DNA منجر به ایجاد کدون پایان و تولید یک پروتین ناقص می‌گردد که این جهش را پاتوژن می‌سازد. به‌طورکلی لازم است این دو جهش تکرارشده در جامعه ایرانی، در مطالعات آنالیز جهش و مشاوره ژنتیک جمعیت ایرانی مدّنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی در این مطالعه برای اولین‌بار ۴ جهش جدید مرتبط با بیماری NF1 گزارش گردید. همچنین یک جهش که قبلاً فقط در

یک فرد ایرانی گزارش شده بود در مطالعه حاضر هم مجدد دیده شد که احتمالاً اندمیک‌بودن این جهش در جمعیت ایرانی را نشان می‌دهد. یکی از جهش‌های مشاهده‌شده هم فراوانی بیشتری در دنیا داشته و قبلاً نیز در ایران گزارش شده است. این یافته‌ها در مشاوره ژنتیک و تشخیص پیش از تولد دارای اهمیت هستند؛ هرچند تأکید می‌گردد با توجه به محدودیت‌های مطالعه حاضر (تعداد کم بیماران و اگزون‌های بررسی‌شده) همچنین با توجه به تنوع و پراکندگی جهش‌ها در این بیماری، لازم است مطالعات بیشتری در ایران انجام گردد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر حاصل نتایج پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته ژنتیک (دانشگاه آزاد واحد ورامین) بوده که در آزمایشگاه ژنتیک پزشکی نور تهران انجام شده است. نویسندگان از کلیه همکاران و پرسنل گرامی آزمایشگاه به‌ویژه سرکار خانم دکتر شیرین قدمی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

***References*:**

[1] Stella A, Lastella P, Loconte DC, Bukvic N, Varvara D, Patruno M, et al. Accurate Classification of NF1 Gene Variants in 84 Italian Patients with Neurofibromatosis Type 1. ***Genes*** 2018; 9(4): 216.

[2] Longo JF, Weber SM, Turner-Ivey BP, Carroll SL. Recent Advances in the Diagnosis and Pathogenesis of Neurofibromatosis Type 1 (NF1)-associated Peripheral Nervous System Neoplasms. ***Adv Anat Pathol*** 2018; 25(5): 353-68.

[3] Lv M, Zhao W, Yan L, Chen L, Cui K, Gao J, et al. Screening for mutation site on the type I neurofibromatosis gene in a family. ***Childs Nerv Syst*** 2012; 28(5): 721-7.

[4] Bora Carman K, Yakut A, Anlar B, Ayter S. Case Report: Spinal neurofibromatosis associated with classical neurofibromatosis type 1: genetic characterisation of an atypical case. ***BMJ Case Rep*** 2013; bcr2012008468.

[5] Malbari F, Spira M, B Knight P, Zhu C, Roth M, Gill J, et al. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors in Neurofibromatosis: Impact of Family History. ***J Pediatr Hematol Oncol*** 2018; 40(6): e359-e363.

[6] Messiaen LM, Callens T, Mortier G, Beysen D, Vandenbroucke I, Van Roy N, et al. Exhaustive mutation analysis of the NF1 gene allows identification of 95% of mutations and reveals a high frequency of unusual splicing defects. ***Hum Mutat*** 2000; 15(6): 541-55.

[7] Zapata Laguado MI, Lizarazo Hurtado DV, Bonilla Gomez CE. Neurofibromatosis Type 1 - Association with Breast Cancer, Basal Cell Carcinoma of the Skin, and Low-Grade Peripheral Nerve Sheath Sarcoma: Case Report and Literature Review. ***Case Rep Oncol*** 2019; 12(1): 228–34.

[8] Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K. The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. ***Proc Natl Acad Sci*** 2005; 102(24): 8573-8 .

[9] Zhang J, Tong H, Fu Xa, Fu X, Zhang Y, Liu J, et al. Molecular characterization of NF1 and neurofibromatosis type 1 genotype-phenotype correlations in a Chinese population. ***Sci Rep*** 2015; 5: 11291.

[10] Koczkowska M, Chen Y, Callens T, Gomes A, Sharp A, Johnson S et al. Genotype-phenotype correlation in NF1: Evidence for a more severe phenotype associated with missense mutations affecting NF1 codons 844–848. ***Am J Hum Genet*** 2018; 102(1): 69-87.

[11] Ars E, Kruyer H, Morell M, Pros E, Serra E, Ravella A, et al. Recurrent mutations in the NF1 gene are common among neurofibromatosis type 1 patients. ***J Med Genet*** 2003; 40(6): e82.

[12] Riva M, Martorana D, Uliana V, Caleffi E, Boschi E, Garavelli L, et al. Recurrent NF1 gene variants and their genotype/phenotype correlations in patients with Neurofibromatosis type I. ***Genes Chromosom Cancer*** 2022; 61(1): 10-21.

[13] 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. ***Int J Mol Med*** 2014; 34(1): 53-60.

[14] Sabbagh A, Pasmant E, Imbard A, Luscan A, Soares M, Blanché H, et al. NF1 molecular characterization and neurofibromatosis type I genotype-phenotype correlation: the French experience. ***Hum Mutat*** 2013; 34(11): 1510-8.

[15] Napolitano F, Dell'Aquila M, Terracciano C, Franzese G, Gentile M, Piluso G, et al. Genotype-Phenotype Correlations in Neurofibromatosis Type 1: Identification of Novel and Recurrent NF1 Gene Variants and Correlations with Neurocognitive Phenotype. ***Genes*** 2022; 13: 1130.

[16] Foji S, Dorgaleleh S, Oladnabi M, Jouybari L, NF1. Mutations Analysis Using Whole Exome Sequencing Technique in 11 Unrelated Iranian Families with Neurofibromatosis Type 1. ***Int J Pediatr*** 2020; 8(5): 11311-319.

[17] Britney N. Wilson, BA, MS, Ann M. John, MD, Marc Zachary Handler, et al. Neurofibromatosis Type 1: New Developments in Genetics and Treatment. ***J Am Acad Dermatol*** 2020; 48(6): 1667-76.

[18] Valero MC, Martín Y, Hernández-Imaz E, Hernández AM, Meleán G, Valero AM, et al. A highly sensitive genetic protocol to detect NF1 mutations. ***J Mol Diagn*** 2011; 13(2): 113-22.