

Strokovni prispevek/Professional article

GENSKA DIAGNOSTIKA HEMOFILIJE A

GENETIC DIAGNOSTICS OF HEMOPHILIA A

Maruša Debeljak¹, Majda Benedik-Dolničar², Lana Strmecki³¹ Laboratorijsko diagnostični oddelki, Pediatrična klinika, Klinični center, Vrazov trg 1, 1525 Ljubljana² Služba za onkologijo in hematologijo, Pediatrična klinika, Klinični center, Vrazov trg 1, 1525 Ljubljana³ Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 1, 1525 Ljubljana

Prispelo 2004-02-13, sprejeto 2004-03-12; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 155-7

Ključne besede: hemofilija A; koagulacijski faktor VIII; inverzijska mutacija introna 22

Izvleček – Izhodišča. Hemofilija A je recesivna dedna bolezen, vezana na kromosom X, z motnjo v strjevanju krvi. Hemofilija A je posledica različnih mutacij v genu za faktor VIII. V Slovenskem registru je zabeleženih 163 bolnikov s hemofilijo A, 74 od teh jih ima težko obliko bolezni. Približno 50 odstotkov bolnikov s težko obliko bolezni ima inverzijsko mutacijo introna 22, ki jo ugotavljamo s pomnoževanjem dolgih odsekov DNK. Točkovne mutacije iščemo s pomnoževanjem različnih eksonskih zaporedij v genu za faktor VIII in nato z direktnim sekvenciranjem.

Rezultati. V slovenski populaciji smo doslej odkrili gensko mutacijo pri 67/163 bolnikih s hemofilijo A, od tega pri 36/67 inverzijsko mutacijo in še 12 različnih točkovnih mutacij pri 31/67 bolnikih. Tri od dokazanih točkovnih mutacij so bile opisane samo pri slovenskih bolnikih.

Zaključki. Določitev mutacij pri hemofilikih je zelo pomembna zaradi pravočasnega odkrivanja prenašalk hemofilije in diagnosticiranja hemofilije A pred rojstvom.

Uvod

Hemofilija A je recesivna dedna bolezen, vezana na kromosom X, z motnjo v strjevanju krvi. Pojavlja se pri vseh etničnih skupinah z enako pogostostjo, 1-5/10.000 rojenih dečkov (1). Pri hemofiliji A gre za pomanjkanje, odsotnost ali neaktivnost koagulacijskega faktorja VIII. Glede na aktivnost faktorja VIII ločimo težko (aktivnost faktorja VIII je nižja od 1% oz. nižja od 0,01E/ml normalne aktivnosti), srednje težko (1-5% oz. 0,01-0,05 E/ml) in lahko obliko bolezni (5-30% oz. 0,05-0,30 E/ml). Znižano koncentracijo faktorja VIII povzročijo različne mutacije v genu za faktor VIII.

Gen za faktor VIII leži na koncu dolge ročice kromosoma X, na položaju Xq28. Gen zavzema 186 kb dolgo regijo in je sestavljen iz 26 eksonov, ki nosijo zapis za 9000 bp dolgo mRNK. Ta se prevede v 2351 aminokislin (2). Posebnost gena za faktor VIII je, da je v intronu 22 zaporedje za dodatni manjši gen, ki se imenuje gen A (F8A, *int22h-1*). Dodatni kopiji tega gena (F8A, *int22h-2* in *int22h-3*) sta zapisani na telomernem koncu kromosoma X. Od gena za faktor VIII sta oddaljeni 500 kb. Vloga gena F8A še ni pojasnjena, vendar je gen F8A vpleten v mehanizem pogoste inverzijske mutacije pri bolnikih s težko obliko hemofilije A (3).

Key words: hemophilia A; coagulation factor VIII; intron 22 inversion mutation

Abstract – Background. Hemophilia A is a chromosome X-linked bleeding disorder due to mutations in the FVIII gene. There are 163 hemophilia A patients in Slovene registry for Hemophilia. 74 have severe hemophilia A and 50% of patients with severe hemophilia A have inversion of intron 22 that is detected using the LD-PCR method. Point mutations are detected by amplification of exons of the factor VIII gene followed with a direct sequencing technique.

Results. In the Slovene population we managed to determine a genetic mutation in 67/163 patients, 36/67 have inversion of intron 22 and another 31/67 have 12 different point mutations in the FVIII gene which cause hemophilia A. Three of them are so far found only among Slovene patients.

Conclusions. The identification of hemophilia mutations is of great importance for the timely discovery of the hemophilia carriers and the pre-natal diagnostics of hemophilia A.

Opisane so številne mutacije gena za faktor VIII. Približno 50 odstotkov bolnikov s težko obliko bolezni ima inverzijsko mutacijo introna 22, v katero je vpleten mehanizem homologne rekombinacije med geni F8A (4). Preostali bolniki imajo največkrat mutacije gena, ki so značilne za določeno družino. Do danes je opisanih 830 različnih mutacij v genu za faktor VIII, od tega je 551 zamenjav enega nukleotida, 108 primerov večjih delecij (2-210 kb) in 118 manjših (1-23 bp) delecij, 42 primerov insercij in že prej omenjena inverzija (5).

Materiali in metode

Preiskovanci

V Sloveniji je registriranih s hemofilijo A 163 bolnikov iz 107 rodbin, 74 od vseh skupaj jih ima težko obliko bolezni. Diagnoza bolezni temelji na značilnih kliničnih znakih bolezni in zmanjšani aktivnosti faktorja VIII (FVIII:C) v krvi. Aktivnost določimo z modificirano metodo APTT (angl. Activated Partial Tromboplastin Time, IL Test™ KIT) na avtomatskem koagulometru ACL 7000 (Instrumentation Laboratory Spa).

Genska diagnostika

Genomsko DNK izoliramo po uveljavljeni metodi iz levkocitov periferne krvi z izsoljevanjem (6) ali iz horionskih resic, kadar gre za prenatalno diagnostiko (7).

Mutacije gena za FVIII pri preiskovanih bolnikih smo iskali s kombinacijo več metod.

Pri hemofilikih s težko obliko bolezni najprej iščemo prisotnost inverzijske mutacije introna 22. Za ugotavljanje inverzije uporabljamo metodo pomnoževanja dolgih odsekov DNK (LD-PCR, angl. **L**ong **D**istance - **P**olymerase **C**hain **R**eaction), ki je nadomestila metodo po Southernu. Z metodo LD-PCR pomnožimo neoamplikon, ki nastane, ko se intronski homolog *int22h-1* rekombinira z enim od zunajgenskih homologov (*int22h-2* ali *int22h-3*). Pomnožena regija je dolga 10 kb. Ta PCR potrebuje precej spremenjene pogoje: 150 ng visokomolekularne genomske DNK, DMSO (5-7%), posebno polimerazo *Expand* (Roche Diagnostics) in poleg običajnih nukleotidov še 7-deazni-dGTP (Roche Diagnostics). Uporabljamo oligonukleotidne začetnike po Liu in Sommerju (8). Reakcija PCR je sestavljena iz 30 obratov s časovno temperaturnim profilom 30 sek 92 °C, 1 min 65 °C in 15 min 68 °C.

Točkovne mutacije iščemo s pomnoževanjem eksonskih zaporedij (eksoni: 1, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 18, 22, 23, 24, 26) v genu za faktor VIII in pri tem uporabljamo ustrezne oligonukleotidne začetnike (9). Pomnožene regije direktno sekvenciramo s kapilarno elektroforezo (Applied Biosystems, PE). S primerjavo zaporedij med zdravimi in bolniki ugotavljamo spremembe zaporedja pri bolnikih in ovrednotimo, kakšne so spremembe pri bolniku tudi na ravni aminokislin.

Rezultati

Od skupno 163 bolnikov s hemofilijo A jih ima 74 težko obliko hemofilije A. Skupno smo 67 bolnikom opredelili gensko mutacijo za faktor VIII. V skupini 67 opredeljenih jih ima 48 težko hemofilijo A; 36/48 inverzijo introna 22, ki je večkrat opisana kot vroča točka za mutacijo, pri 12/48 pa smo dokazali 7 različnih neinverzijskih mutacij. Pri še 15 od skupaj 74 hemofilikih s težko obliko hemofilije inverzijske mutacije nismo dokazali, druge mutacije v eksonih pa še nismo iskali. Pri 19 bolnikih z lahko oz. srednjo hemofilijo A smo dokazali 5 različnih točkovnih mutacij.

Razpr. 1. Seznam mutacij v genu za faktor VIII pri slovenskih bolnikih.

Table 1. List of mutations in the factor VIII gene in Slovene patients.

Mutacija	Pozicija v genu	Število bolnikov	Oblika hemofilije A
Mutation	Gene position	No. patients	Severity of hemophilia A
S19R	ekson / exon 1	1	težka / severe
S289L	ekson / exon 7	3	lahka / mild
R282H	ekson / exon 7	2	težka / severe
R336X	ekson / exon 8	1	težka / severe
R593C	ekson / exon 12	2	lahka / mild
Q602X	ekson / exon 12	3	težka / severe
R1966X	ekson / exon 18	1	težka / severe
Inverzija introna 22	intron 22	36	težka / severe
R2150H	ekson / exon 23	1	srednja / moderate
R2147X	ekson / exon 23	3	težka / severe
IVS23+1G→A	intron 23	1	težka / severe
R2209Q	ekson / exon 24	3	lahka / mild
R2307Q	ekson / exon 26	10	lahka / mild

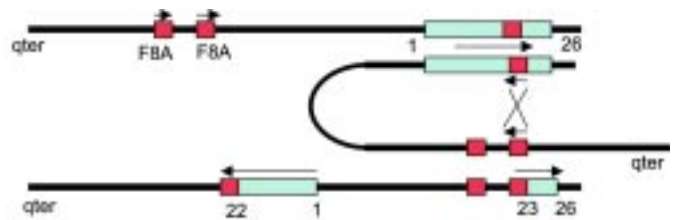
Med letoma 1989 in 2003 je bilo opravljenih 14 prenatalnih diagnostik hemofilije A; pol je bilo deklic, pol pa dečkov. Od 7

dečkov so bili 3 zdravi, po odločitvi staršev sta se dva rodila s hemofilijo, pri dveh pa je bil narejen splav (pri enem zaradi mukopolisaharidoze tipa 1 ob neznanem statusu hemofilije A; pri drugem zaradi težke oblike hemofilije A).

Razpravljanje

Mutacije pri hemofiliji A v grobem lahko delimo v dve skupini: bolniki z inverzijsko mutacijo introna 22 (težka oblika hemofilije A) in bolniki s točkastimi mutacijami v eksonskih zaporedjih gena za faktor VIII (težke, srednje in lahke oblike hemofilije A).

Do inverzijske mutacije introna 22 prihaja večinoma v moških zarodnih celicah, ker parjenje homolognih kromosomov med meiozo pri ženskah zavira možnost intrakromosomske inverzije introna 22. Pri moških je kromosom x nehomologen, zato lahko pride pri meiozi do vihanja kromosoma in rekombinacije med dvema genoma F8A, ki sta na različnih delih kromosoma x (Sl. 1) (10). V Sloveniji smo večino inverzij introna 22 določili z metodo



po Southernu (11). Inverzije sedaj določamo z metodo LD-PCR, za katero smo ugotovili, da je prav tako ustrezna. LD-PCR precej skrajša čas od osamitve DNK do molekularnogenetskega izvida. Za LD-PCR tudi ne potrebujemo radioaktivno označenih nukleotidov, ki so dragi in zdravju škodljivi. Z različnimi kombinacijami primerno izbranih oligonukleotidnih začetnikov, ki nalegajo v gene *int22h-1* in *int22h-2* ali *int22h-3*, že iz vzorca amplifikatov ugotovimo, ali gre za bolnika z inverzijo oz. za prenašalko ali za osebo brez inverzije introna 22.

Točkovne mutacije iščemo s PCR in direktnim sekvenciranjem. Večina odkritih točkovnih mutacij je v dinukleotidnem zaporedju CpG. Visok delež mutacij v zaporedju CpG ni presenetljiv, saj ta zaporedja veljajo za najbolj mutagena v človeškem genomu. Pri sesalcih je citozin v zaporedju CpG pogosto metiliran. Deaminacija metiliranega citozina privede do nastanka timina, ki ga DNK popravljalni mehanizmi ne prepoznajo kot napako (12). Samo tri mutacije niso v tem zaporedju in vse so bile doslej odkrite samo pri slovenskih bolnikih (13, 14).

Ko ugotovimo mutacijo, ki je značilna za neko družino, določimo še prenašalko za hemofilijo A. Prenášalkam se v 10. do 12. tednu nosečnosti lahko napravi še prenatalna diagnostika. Družinam, ki še nimajo določene družinske mutacije, lahko pri ugotavljanju prenašalk in nato pri prenatalni diagnostiki pomagamo s posredno gensko analizo, ki sloni na vezanem dedovanju intronskih polimorfizmov. Te večinoma določamo z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), ki so v intronih med posamezniki zelo variabilne. Analiza je uporabna le, če je družina informativna za RFLP.

Odkrivanje prenašalk hemofilije je pomembno tudi zato, da čim bolj zgodaj dokažemo tiste prenašalko, ki imajo tako zelo znižano koncentracijo strjevalnega faktorja VIII, da pomeni za njih operacija oziroma težja poškodba enako tveganje kot pri bolniku z lahko hemofilijo A.

Zaključki

Določitev mutacij pri hemofilikih je zelo pomembna zaradi pravočasnega odkrivanja prenašalk hemofilije in diagnostici-

ranja hemofilije pred rojstvom. To diagnostiko nam zanesljivo omogoča genska diagnostika hemofilije A, zato gre za pomembno molekularnobiološko preiskavo za slovensko populacijo.

Zahvala

Za pomoč za zbiranje podatkov o družinah s hemofilijo se zahvaljujemo gospe Rajki Bavčer, sodelavki Društva hemofilikov Slovenije.

Literatura

1. Stamatoyannopoulos G, Nihuis AW, Majerus PW, Varmus H. The molecular basis of blood diseases. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, The Curtis Centre, Independence Square West, 1994: 890–8.
2. Gitscher J, Wood WI, Goralka TM et al. Characterisation of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326–30.
3. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Haemophilia A. *Nature Genetics* 1993; 5: 236–41.
4. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M et al. Factor VIII inversions in severe hemophilia A: results from an international consortium. *Blood* 1995; 86: 2206–12.
5. HAMSTeRS (angl. **H**aemophilia **A** **M**utation **S**earch, **T**est and **R**esource **S**ite), <http://europium.rpms.ac.uk>
6. Miller SA, Dyches DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; 16: 1215–5.
7. Davies KE. Human genetic diseases. A practical approach. Oxford: IRL Press Limited, 1987: 245–5.
8. Liu Q, Sommer SS. Subcycling-PCR for multiplex long distance amplification of regions with high and low GC content application to the inversion hot-spot in the FVIII gene. *Biotechniques* 1998; 25: 1022–8.
9. Strmecki L. Iskanje in opredelitev mutacij gena za koagulacijski faktor VIII pri hemofiliji A. Doktorsko delo. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1998: 95–106.
10. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Molec Genet* 1994; 3: 1035–9.
11. Strmecki L, Benedik-Dolničar M, Vidan-Jeras B, Komel R. Inversions of the factor VIII gene in Slovenian patients with severe haemophilia A. *Eur J Haematol* 1999; 63: 64–6.
12. Youssofian H, Kazazian HH, Phillips DG et al. Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature* 1986; 324: 380–2.
13. Strmecki L, Benedik-Dolničar M, Komel R. A novel mutation Q602STOP in exon 12 of the FVIII gene. *Human Heredity* 1998; 48: 119–20.
14. Strmecki L, Benedik-Dolničar M, Vouk K, Komel R. Screen of 55 Slovenian haemophilia A patients: identification of 2 novel mutations (S-1R and IVS23+1G:A) and discussion of mutation spectrum. *Hum Mutat* 1999; 13: 413–3.