

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI

138120

**TÜRK HEMOFİLİ A HASTALARINDA FAKTÖR VIII GENİNİN
I. İNTRONUNDAKİ İNVERSİYONUN ARAŞTIRILMASI**

Uz. Dr. Mustafa PEHLİVAN

138120

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Filiz BÜYÜKKEÇECİ

T.C. YURSEKURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Hematoloji Yan Dal

Uzmanlık Tezi

İZMİR-2003

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi, yönlendirilmesi aşamalarında her türlü desteği veren Prof. Dr. Filiz Büyükkeçeci'ye ve Hematoloji Bilimdalı öğretim üyesi olarak kendisi ile uzun süre çalışma olanağı bulduğum, bilgisi, tecrübesi ve hoşgörülü yaklaşımları ile keyifli bir iş ortamı sağlayan Prof. Dr. Murat Tombuloğlu, Doç. Dr. Seçkin Çağırğan ve Doç. Dr. Serdar Bedii Omay'a, uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım hematoloji kliniğinin tüm uzmanlarına, asistanlarına, hemşirelerine, sekreterlerine ve diğer personeline bana gösterdikleri dostça yakınlık nedeni ile sevgilerimi sunuyorum.

Bunun yanında Hemofili A hasta desteği veren ve sonuçların değerlendirilmesi ve yönlendirilmesi aşamalarında her türlü desteği Prof. Dr. Kaan Kavaklı'ya ve Faktör VIII geni 1. intronunda inversiyon tipi mutasyonu olan kontrol DNA'sı sağlayan "*Schattauer GmbH - Verlag für Medizin und Naturwissenschaften-Almanya*" ekibinden Dr. Cemal Uen (Ün)'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak çalışmalarım sırasında anlayış ve sevgi gösteren aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

Saygılarımla..

Uz. Dr. Mustafa PEHLİVAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇ KAPAK	1
ÖNSÖZ	2
İÇİNDEKİLER	3
GİRİŞ VE AMAÇ	4
A.) GENEL BİLGİLER	5-19
A.1) Kanama Tipleri	6-7
A.2) Hemofili A Taşıyıcılarının Belirlenmesi	8-10
A.3) Faktör VIII Gen Yapısı ve Hemofili A Mutasyonları	10-14
A.4) Faktör VIII Geninin Türk Toplumunda Belirlenen Mutasyonları	14-15
A.5) Mutasyonların Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	15-17
A.6) Hemofili A'nın Gen Tedavisi	17-19
B.) HASTALAR VE YÖNTEM	20-26
B.1) HASTALAR	20-24
B.2) YÖNTEM	24-26
C.) BULGULAR	27-32
D.) TARTIŞMA	33-35
E.) TÜRKÇE ÖZET	36
F.) İNGİLİZCE ÖZET	37
G.) KAYNAKLAR	38-44

GİRİŞ VE AMAÇ

Hemofili A klinik bulguların taşıyıcılarda nadiren gözleendiği cinsiyete bağı geçiş gösteren kanama bozukluğudur. X kromozumu üzerinde Xq28 bölgesinde yer alır ve 186 kb uzunluğunda, 26 ekzondan oluşan en büyük genlerden biridir (1,2,3). Hemofiliye neden olan gendeki mutasyonların çok olması genin doğrudan analizini engellemektedir (4). Doğum öncesi tanı isteyen aileler, direkt tanı alamadıkları için zorlanmakta, hatta çocuk erkek ise hamileliğinin sonlanmasını isteyebilmektedir. İnversiyon tipi mutasyonların belirlenmesinde long PCR kullanılmakta olup bunun dışında multiplex PCR, PCR-RFLP, DGGE, CMC, DNA analizi mutasyon taraması ve allel geçişlerinin belirlenmesi de kullanılmaktadır (4-7). Hemofili hastalarının tedavisi pahalı olup hemofilili çocuğa sahip aileler hem maddi hem de manevi yönden büyük zorluklar yaşamaktadırlar. Birkaç hastada bu mutasyonun direkt veya indirekt yolla belirlenmesi sonucu, verilecek doğum öncesi tanı yardımıyla milyarlarca lira harcanmayacak ve de özellikle aile manevi yönden daha az zarar görecektir.

Bu tez çalışmasında; Hemofili A'ya neden olan Faktör VIII genine ait ve de Türk hastalarında önceden çalışılmamış olan genin I. İntron'undaki inversiyon tipi mutasyonun bulunup-bulunmadığı analiz edilmiştir (1,8,9). Bu bölgenin çalışılması ile hemofilili Türk hastalarına ait mutasyon paneli genişlemiş ve literatüre katkıda bulunulmuştur.

A.) GENEL BİLGİLER

Kanın pıhtılaşma sisteminde rol alan Faktör VIII ve IX ' un kalıtsal olarak eksikliği, yokluğu veya işlevinin bozuk olması sonucu ortaya çıkan, genetik geçiş gösteren kronik komplike bir hastalıktır. Bu günkü anlamda Hemofili 1920 yılında tanımlanmış ve 1937 'de patogenezi belirlenmiştir. Hemofili sıklığı; ülkeler arasında tipleri değişiklik göstermekle beraber 10.000 erkek doğumda 1'dir. Coğrafi ve etnik bir farklılık bilinmemektedir (4,8).

Hemofili, eksik olan faktörün cinsine ve miktarına bağlı olarak isimlendirilir. Faktör VIII eksikliği Hemofili A, Faktör IX eksikliği ise Hemofili B olarak adlandırılır. Hemofili A koagülasyonun en sık görülen herediter hastalığı olup 5 kez daha fazla görülür. FVIII plazmada vWF'e bağlı olarak dolaşır. FVIII'in pıhtılaşmada asıl fonksiyonu olan parçası FVIII:C'dir. Hemofili A hastalarında FVIII:C ve onun fonksiyonel ve immunolojik özellikleri eksik veya bozuktur. Hastaların bir kısmında faktör düzeyi belirgin azalmış, bazılarında ise normal konsantrasyonlarda olmasına karşın nonfonksiyonel molekül sentezi vardır. Her iki durumda da klinik tablo aynıdır. Kanama sıklığı ve şiddeti faktör VIII, IX düzeyi ile doğru orantılıdır. Bir ailede etkilenen bireylerin eksiklik ve kanama dereceleri de benzer olma eğilimindedir. Plazmadaki normal faktör düzeyleri % 50-150 ünite arasında değişir. Faktör düzeyi %50'nin altında olduğu hastalarda ağır travmalar kanamalara neden olur. Faktör düzeyinin normalin %40'ın altında olmasına (0.05-0.4 IU/mL) hafif tip hemofili denir. Genellikle sessiz seyreder ve erişkinlerde ağır travmalar ve cerrahi girişim sonrasında kanamalar görülür. Faktör düzeyi normalin %1-5 arasında ise (0.01-0.05 IU/mL) orta tip hemofili, normalin %1'in altında ise (<0.01 IU/mL) ağır hemofili denir (8,10).

Doğumda yüksek konsantrasyonda doku faktörü varlığında ekstremsel koagülasyon sisteminin fonksiyonu hemostazı sağladığından umbilikal korddan kanama nadirdir. Ağır hemofilili hastalar spontan ve küçük travmalar ile sık eklem, kas ve deri kanamaları

gösterirken, orta hemofilili olgularda genellikle küçük travmalar ile kanama görülür. Hafif hemofili olgular ise ciddi travma veya cerrahi girişim sonrası kanama eğilimindedir (8).

A.1) Kanama tipleri:

Hemartroz: Sık olarak diz, ayak bileği, kalça, dirsek gibi büyük eklemlerde görülür ve aynı eklemlerde tekrarlama eğilimindedir. Akut hemartrozda etkilenen eklemde şiddetli ağrı, şişme, hareket kısıtlılığı ve ısı artımı vardır. Tekrarlayan hemartrozlar eklemde kalıcı deformite ve ankiloza neden olabilir. Komşu kaslarda kullanılmama atrofisi gelişebilmektedir.

Yumuşak doku hematomları: Kas ve yumuşak dokularda görülür.

Anatomik alanlara kanama: Özellikle farinks ve boyun bölgesinde kanamalar hava yolunda obstrüksiyona neden olabileceği için önemlidir.

GİS ve barsak duvarı içine kanamaları: Parsiyel intestinal obstrüksiyonlara neden olabilir.

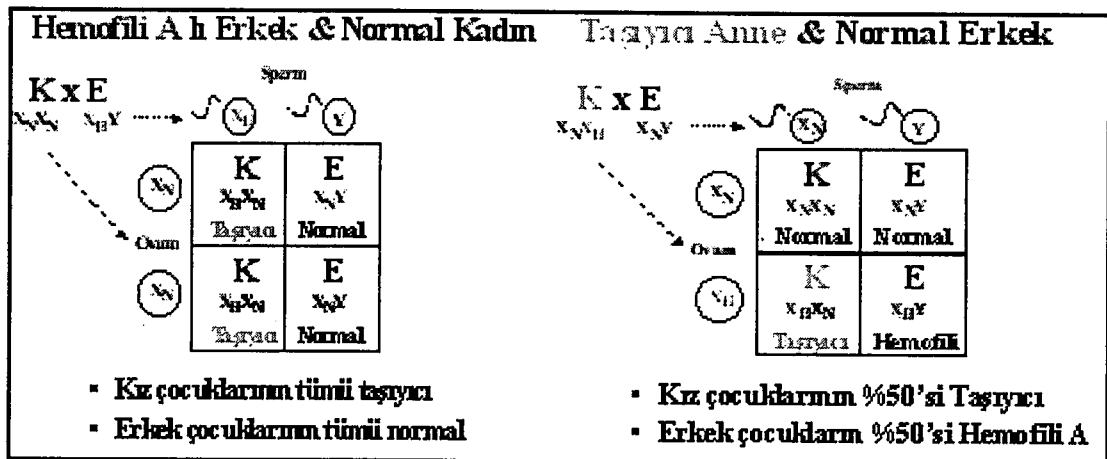
Hematüri: Ağrısız ve pıhtı oluşumuna bağlı üretral kolik ile birlikte olabilir ve tıkanmalara neden olabilir.

SSS kanamaları: Subdural hematomlar ve diğer kanamalar sık görülmemesine karşın mortalitenin önemli bir nedenidir.

Cerrahi sonrası kanama: Diş çekimini de kapsayan küçük ve büyük cerrahi girimlerde ciddi kan kaybı olabilir. Ülkemizde sünnetten sonra olan kanama önemlidir. Ağır ve orta

hemofilili hastalarda çocuk hareketlenmeye, yürümeye başlayınca hafif hemofili hastalarda ise genellikle adolesan yaşlarda kanamalar ortaya çıkar (10).

Hemofili A en yaygın koagülasyon defektlerinden biridir. Tüm toplumlarda yaklaşık 5000 erkek çocuktan birinde görülmekte olup X'e bağlı geçiş gösteren bir hastalıktır. Hastalığa ait kusurlu gen, X kromozomunun uzun kolunda bulunur. Gen 1980'li yıllarda belirlenmiş ve geçen sürede hastalığı taşıyan anneler ve hasta erkek çocukların kromozom analizleri sonucu hastalığa ait genetik mutasyonların ayırımı yapılmıştır. Hastalık hemen tümüyle erkeklerde görülür. İki X kromozomundan birindeki Faktör VIII (FVIII)' in bozuk olduğu kadınlar asemptomatik taşıyıcılardır (Şekil 1). Hastalık X kromozomu üzerinde Xq28 bölgesinde bulunan faktör VIII genlerinde meydana gelen son derece heterojen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Hemen hemen her ailede kendine özgü mutasyon bulunmakta olup hastaların % 30 kadarının ise aile öyküsü yoktur. Bu gibi olgularda fenotipik analizle de birleştirilse polimorfizmlere dayalı tanı yöntemleri sonuç vermez (4,8,11). Hastalığın kesin bir tedavisi yoktur ve hastalığın etkisi, saflaştırılmış FVIII replasmanı ile geçici olarak ortadan kaldırılmakta ve aynı zamanda topluma önemli bir yük getirmektedir. Hemofili taşıyıcıları faktör VIII koagülan aktivitelerinin ölçülmesi ile saptanamamaktadır (10,12).



Şekil 1: X'e bağlı resesif geçiş gösteren Hemofili A'nın aile ağacı gösterimi.

A.2) Hemofili A Taşıyıcılarının Belirlenmesi

A.) Öncelikle ayrıntılı bir aile ağacı çizilerek ailedeki hemofilili bireyler ile olası ve kesin ya da zorunlu taşıyıcılar belirlenir. Bundan sonraki incelemelerin hangi bireylerde yoğunlaşması gerektiği böylece saptanmış olur (13). Aile ağacına göre zorunlu ve olası taşıyıcılar şunlardır:

Zorunlu taşıyıcılar:

1. Bir hemofilili babanın tüm kızları
2. Ayrı doğumlarda birden fazla hemofilili çocuk doğuran kadınlar
3. Bir hemofilili oğlu olup anne tarafında iyi kanıtlanmış hemofilili bir başka birey olan kadınlar
4. Bir hemofililinin anneannesi olup, anne tarafında hemofili öyküsü olanlar.

Olası taşıyıcılar:

1. Taşıyıcı olan bir kadının yukarıdaki ölçütlere uymayan kadın akrabası
2. Anne tarafında hemofili öyküsü olan ancak bir hemofilili oğlu olmayan kadınlar
3. Aile öyküsü olmadan bir hemofilili oğlu olanlar:
 - a) Hemofilik gen kadına annesinden geçmiştir; ancak ya yakın erkek akrabaların (erkek kardeş, dayı gibi) olmaması ya da olan erkek akrabaların tesadüfen hemofilik olmaması nedeniyle bu gen belirlenmemiştir.
 - b) Kadında yeni bir mutasyon olmuştur.
 - (i) Mutant gen kadının tüm hücrelerindeki X kromozomlarından birindedir; bunlar gerçek taşıyıcılardır.
 - (ii) Yalnızca tek bir germ hücresinde (ovumda) mutant gen vardır, somatik

hücrelerde mutasyon yoktur; bunlar taşıyıcı değildir.

B.) Fenotipik inceleme: Taşıyıcı olduğundan kuşkulanan bireylerde Faktör VIII:C/Faktör VIII:Ag ya da Faktör VIII:C/von Willebrand faktör:Ag oranına bakılır. Bu oran 0.6'nin altında ise bireyin taşıyıcı olma olasılığı güçlüdür. Ancak iyonizasyon nedeniyle bu oranın aşağı ya da yukarı değişebileceği unutulmamalıdır (8,12).

C.) DNA inceleme yöntemleri:

Hastalığa ait mutasyon biliniyorsa, örnekte ilgili mutasyonun olup olmadığı moleküler genetik yöntemlerle analiz edilerek belirlenir. Mutasyon bilinmiyorsa indirekt tanı yöntemlerinden yararlanılır. Bunlara; PCR yardımıyla gerçekleştirilen DNA polimorfizmleri, RFLP, VNTR, SSCP DGGE v.b. yöntemler örnek olarak verilebilir (4,6,9,14-19).

Hemofili A'ya yol açan mutasyonlar çok çeşitli olup şu gruplar altında toplanabilir:

1. Nokta mutasyonları

- a. Yanlış anlamlı (Missense)
- b. Çerçeve kayması
- c. Stop kodon
- d. "Splice" mutasyonlar

2. Delesyonlar

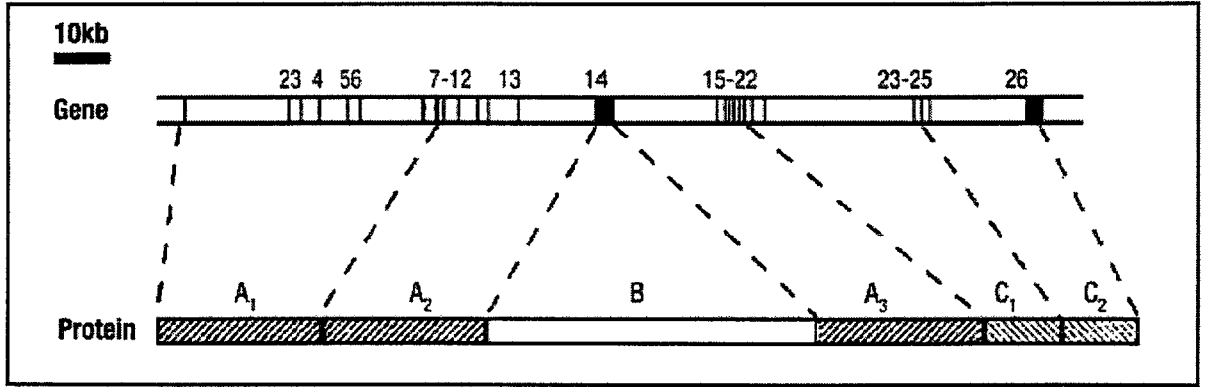
3. İnsersiyonlar

4. İnversiyonlar

Mutasyonların bilinmesi ise sadece taşıyıcıların kesin olarak tanımlanmasını değil aynı zamanda hastalığın sebebinin açıklanmasını da sağlamakta ve proteinlerin işlev/yapı ilişkilerinin anlaşılması açısından çok büyük önem taşımaktadır (20-22). Ayrıca tedavi gören hemofili hastalarında inhibitör oluşumunun temelini açıklanmasında yol göstermektedir. Giderek gelişen teknik olanaklarla daha çok mutasyon belirlenmekte ve hastaların moleküler patolojisi ortaya çıkmaktadır. FVIII geninin klonlanması aynı zamanda hemofili tedavisinde kullanılmak üzere rekombinant faktör üretilmesi ve gen tedavisine de olanak sağlamaktadır (12,23-26).

A.3) Faktör VIII Gen Yapısı ve Mutasyonları

İnsan genomundaki bilinen en büyük genlerden biri olan FVIII geni 186 kilobaz (kb) uzunluğunda olup 96 kb uzunluğundaki cDNA'sı ise 2351 aminoasitlik FVIII proteinini kodlamaktadır (7,11). FVIII geninde 26 ekzon ve 25 intron bulunmakta olup bu büyük genin mRNA'sı da 9 kb uzunluğunda ve 7052 nükleotidden oluşan bir diziye sahiptir. Promotor elementlerinin, ekzon / intron kırılma yerlerinin dizisi bilinmekte ama İntron dizilerinin çoğu bilinmemektedir. 5' ucundaki transkripsiyon başlama bölgesi -170'de bulunmakta ve 3' bölgesinde poly (A) sinyalini içeren yaklaşık 2kb uzunluğunda transkripsiyon yapılmayan dizisi vardır (Şekil 2) (7,11,27-29). Oluşan protein bir heterodimerdir. A1 ve A2 ağır zinciri oluşturur, B domain ise değişen uzunluğa sahiptir. Hafif zincir A3, C1, C2 domainlerinden oluşur. A3 faktör VIII'in stabilitesi için önemlidir (14).



Şekil 2: Faktör VIII Geninin kodladığı aktif protein yapısı

Önceleri yapılan araştırmalarda hafif ve orta ağırlıktaki hemofilili hastaların %90'ında mutasyon belirlenirken, ağır hemofilililerin ancak %50'sinde hastalığa yol açan mutasyon belirlenebiliyordu (2). Daha sonra ağır hemofilili hastaların %40'ında FVIII geninin kısmi bir inversiyonunun bulunduğu görüldü. Memelilerde ender rastlanan ve intron içinde bulunan genlerden iki tanesine FVIII intron 22 bölgesinde rastlanmaktadır. FVIIIa ve FVIIIb olarak adlandırılan bu genlerin FVIII'in 300-500 kb yukarı ucunda iki kopyası olduğu saptanmıştır (28,30). FVIIIa, FVIII ile ters yönde sentezlenmekte ve işlevi tam olarak bilinmeyen ancak birçok hücre tipinde anlatımı olan bir proteini kodlamaktadır. 9.5kb uzunluğunda olan bu gen bölgesi "intron 22 homologous region 1" (int22h-1) ve gen dışındaki kopyaları ise int22h-2 ve int22h-3 olarak tanımlanmıştır (23). 2093 hastanın 890'ında (%43) inversiyon mutasyonu saptanmış olup, inversiyonların %83'ü tip 1, %16'si tip 2, %1'i tip 3 olarak bulunmuştur. İnversiyon mutasyonunun bulunması hemofili A'nin moleküler incelemelerinde son derece önemli olup tüm hastaların %25'i, ağır hastaların %40-50'sindeki defektir (2,4,23,27). Faktör VIII geninde hemofili A hastalığı görülen ailelerde taşıyıcı tespiti doğum öncesi tanı için çok faydalı olan birçok gen içi polimorfik bölge yada restriksiyon enzimi kesim dimorfizimi (RFLP) saptanmıştır. İlk olarak intron 18 Bcl 1 ve sonra intron 25 de Bgl 1 dimorfizimleri gösterilmiştir (15,16,19). Bgl 1 RFLP'nin

alel sıklığının toplular arasında büyük farklılık göstermesi RFLP markırlarının farklı toplumlarda taşıyıcı tespiti veya doğum öncesi tanıda kullanımının farklı olabileceğini göstermesi bakımından önemli bir örnektir. Saptanan diğer polimorfizmlerden intron 19 da Hind III, 5' ucunda Taq I ekzon 26'da Msp I polimorfizmleri Bcl I ile "linkage disequilibrium" gösterdiği için tanıda kullanımı sınırlıdır (17,18).

Southern blot yöntemi ile saptanan bu polimorfik bölgeler günümüzde PCR yöntemi ile çalışılmaktadır. Yakın zamana kadar sadece Southern blot yöntemi ile çalışılan Intron 22-XbaI polimorfik bölgesinin de PCR ile çalışılan bölgeler arasındadır (16,18). Ancak faktör VIII genine yakın, alel sayısı çok fazla olan diğer polimorfik bölgeler de, örneğin St14 (DXS52) tanı için kullanılmaktadır (19). Ancak bu bölgeler ile FVIII geni arasında rekombinasyon saptanması ve kesin tanı yöntemlerinin giderek yaygın kullanımı gen dışı markırların tanıda kullanımını kısıtlamaktadır. Son yıllarda intron 13 ve 22 de bulunan iki kısa dizi tekrarı (microsatellite repeats) hem gen içinde hem de çok alelli oldukları için bağlantı analizinde kullanılmaktadır (3,5,31). Bugüne kadar hemofili A hastalığına yol açan ve büyüklükleri 2 ile >210 kb arasında değişen 78 büyük delesyon saptanmıştır. Bunların üç tanesi hariç hepsinde ağır hemofili fenotipi görülmüştür. Faktör VIII geninde 300'den fazla farklı nokta mutasyonu saptanmıştır (Şekil 3) (2,4,30-33).

Büyük delesyonlar (100 nükleotidden fazla) hemofili A'lı hastaların %5 kadarında görülmektedir. Delesyonlar genellikle ağır hemofiliye yol açmaktadırlar. Hemofili A'lı hastaların %10-20'sinde inhibitör gelişmektedir. İnhibitör gelişen hastaların büyük bir çoğunluğundaki moleküler olayın nonsense mutasyon, delesyon ya da inversiyon olduğu görülmüştür (1,8,20,23,29).

Faktör VIII geninin klonlanmasından sonra 2500'den fazla hemofili A hastasının DNA'sı moleküler defekt yönünden incelenmiş ve bir veri tabanı oluşturulmuştur. Söz konusu veri tabanı sürekli olarak güncellenmektedir (HAMSTeRS

<http://europium.mrc.rpms.ac.uk>). CpG dinükloitidlerinde meydana gelen nokta mutasyonları hemofili B de olduğu gibi “hot-spot” ları oluşturmaktadır. Mutasyonların %25'i CpG dinükleotidlerini ilgilendirmektedir. Bu moleküler defektler X kromozomu inversiyonu dışındakilerdir (2,34). Bütün gen bölgesi taranmasına rağmen mutasyonu belirlenemeyen hemofili A hastaları vardır (1). Hastalara ait DNA'larda genin %2'sinde herhangi bir mutasyon bulunmamıştır (1). FVIII geninin regülasyonu ve promotor bölgesi iyi bilinmemektedir. Hemofili A mutasyonlarının orijinlerine bakıldığında erkek:dişi üreme hücrelerinde mutasyon oranı 15:1 olduğu saptanmıştır. Bu durum erkek üreme hücrelerindeki tek X kromozomunun kendi üzerinde kıvrılarak FVIII geninin ekzon 22-1 yönünde okunmasına sebep olan inversiyon ile açıklanmaktadır (8).

A.4) Faktör VIII Genin Türk Toplumunda Belirlenen Mutasyonları

FVIII genlerinin Türk toplumundaki alel frekansları saptanmış ve DNA bağlantı analizi; Hind III, Intron 13 (CA)_n, intron 22 (CA)_n ve St14 VNTR incelemeleri ile hemofili A ailelerinin %92'sinde taşıyıcı tespiti ve doğum öncesi tanının mümkün olduğu bildirilmiştir (3,6). Bunlara paralel olarak yürütülen hemofili ailelerinde hastalığa sebep olan mutasyonu bulma çalışmaları sonucunda ise 38 hemofili A hastasında FVIII-intron 22 inversiyonu bulunmuştur. Intron 22 inversiyonu ağır hemofili hastalarının %41'inde bulunmakta ve diğer toplumlarda saptanan yüzdeler ile benzerlik göstermektedir (6). Türkiye'de saptanan mutasyonların tiplerine göre dağılımı Tablo.1'de gösterilmiştir.

Tablo.1: Türk Hastalarında Saptanan Hemofili A Mutasyonlarının Tiplere Göre Dağılımı

Mutasyon Çeşidi	Mutasyon Sayısı
I. Nokta Mutasyonları	17
Yanlış anlamlı	13
Transisyon	9
Transversiyon	4
A. Stop kodon	3
Transisyon	1
Transversiyon	2
B. Kırılma Noktası	1
II. İnversiyon	38
A. Distal	30
B. Proksimal	8
Toplam	55

İnversiyon mutasyonu taşımayan hemofili A hastalarında 31'inde çeşitli nokta mutasyonları saptanmıştır. Ayrıca iki büyük delesyon ve 8 bazlık bir insersiyon da saptanan mutasyonlar arasındadır. Türk toplumunun mutasyon profili de önemli fark saptamamıştır. Sadece Türk toplumunda faktör VIII geninde büyük delesyonların daha az olabileceği düşünülmüştür (6). Bu projede araştırılan FVIII geni 1. intronunun inversiyon tipi mutasyon önceden Türk popülasyonunda çalışılmamıştır.

A.5) Faktör VIII Gen Mutasyonlarının Saptanmasında Kullanılan Yöntemler;

Mutasyon saptama yöntemleri teknik olarak giderek gelişmekte ve hemofili hastalarının hemen hemen çoğunda mutasyonların belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Hemofilinin moleküler incelemesinde kullanılan başlıca teknikler şunlardır:

- Southern blot ile bağlantı analizi
- Allel spesifik oligonükleotid hibridizasyon
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)
- PCR-Denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE)
- PCR-Tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP)

- PCR + kimyasal kırılma uygunsuzluğu
- PCR-Değişken yineleme dizileri (VNTR)
- Klonlama ve DNA dizi analizi vb (6,35-40).

İnversiyon tipi mutasyonların belirlenmesinde long PCR (İnversiyon mutasyonu) kullanılmakta olup bunun dışında multiplex PCR (İntron 13 ve İntron 22 [CA]_n), PCR-RFLP (İntron 19'daki dimorfizm) belirlenmesi de kullanılmaktadır (5,32,33). Özellikle son yıllarda tarif edilen FVIII intron inversiyonu 1-22 de artık PCR ile saptanabilmekte ve dolayısı ile kesin doğum öncesi tanıya olanak sağlamaktadır (1,32).

PCR'a dayalı yöntemlerin geliştirilmesi, nokta mutasyonlarının daha etkin ve hızlı bir şekilde saptanmasını sağlamıştır. Birçok gende mutasyonların belirlenmesi PCR ve dizi analizi ile yapılmaktadır. Dizi analizi ile mutasyon saptamak en etkin yöntemdir. Çünkü DNA dizisinin belirlenmesi mutasyonun oluşumunu açıklayan bütün bilgiyi ortaya çıkarmaktadır. Ancak hemofililerde mutasyonların heterojen olması genin bütün önemli bölgelerinin taranmasını gerektirmektedir (4). Faktör VIII geni büyük olduğu için her hastada dizi analizi yapmak zaman alıcı ve çok zahmetlidir. Büyük genlerde çalışmayı hızlandırmak amacıyla genin kodlayıcı kısımlarını bölgelere ayırarak bu bölgelerde herhangi bir değişikliğin meydana gelip gelmediğini gösteren yöntemler geliştirilmiştir (38,39).

Faktör VIII genlerinin klonlanması ve geniş çaplı analizleri sonucu bu genlerde bir çok polimorfizm ve mutasyonun saptanması mümkün olmuştur (1,2,8). Polimorfizmler mutasyon taşıyan genin kalıtımını takip etmek için kullanılmaktadır. Bağlantı analizi olarak bilinen bu yöntem mutasyonun saptanmadığı durumlarda kullanılmaktadır. Hastalığa yol açan mutasyon saptanmış ise taşıyıcılar (mozaikler hariç) kesin olarak belirlenebilmekte ve kesin doğum öncesi tanı verilebilmektedir (8). DNA düzeyinde yapılan incelemelerde, hemofili hastalığı görülen ailelerde taşıyıcıların kesin olarak belirlenmesi ve bunun sonucunda doğum öncesi tanı olanağının sunulması, ülkeye ve ailelere büyük maddi ve

manevi yük getiren hastalığın önlenmesi açısından son derece önemlidir (1,3). DNA polimorfizmlerinin incelenmesinde bir diğer dikkat edilmesi gereken nokta polimorfizmlerin ırklara göre değişiklik göstermesidir. Bu nedenle aynı polimorfizmin farklı ırklardaki heterozigotluk oranı ve dolayısıyla tanıdaki değeri farklı olabilmektedir. Özellikle Kuzey Amerikalı ve Avrupalı toplumlarla Japon ve Çinli toplumlar arasında önemli farklar saptanmaktadır. Kullanılan prob sayısı ne kadar çok olursa doğru bir şekilde taşıyıcı tanısı koyma olanağı o kadar fazladır (8,17,18).

A.6) Hemofili A'da Gen Tedavisi

Gen nakli birçok hastalıkta olduğu gibi X kromozomundaki genetik defektin belirlenebildiği hemofili olgularında da hayli ilgi çekmektedir. Başarılabildiği takdirde gen naklinin küratif bir yöntem olduğu bilinmektedir. Bugün büyük moleküllü FVIII, FIX genleri fibroblast kültürlerinde üretilmektedir. Bu moleküller retrovirüslerle hücreye sokularak viral genomun hücre DNA'sına bağlanmasını sağlar (41). Daha sonra virüs ya direkt olarak hücrede çoğalır, vektör virüs DNA'ya bağlanıp kendini üretir ya da her iki işlem birlikte olabilir. Böylece anormal kısım tamamlanarak hücrenin normal faktör üretmesi beklenir. Avantajları arasında; geniş konak hücre oranı, devamlı geç transdüksiyon olanağı ve güvenli olması sayılırken, doku özgüllüğünün kaybolması, sadece bölünen hücrelerde transdüksiyon (insersiyonun kontrolü yapılması) yapması ve düşük titre de olması da dezavantajları olarak görülmektedir. Bugün gen tedavisinde amaç, birkaç ayda bir gen nakledilerek plazmada %5-10 ünite civarında faktör düzeyi sağlayarak, spontan kanamaları önlemek ve hayat kalitesini yükseltmektir. Bu yöntem bir anlamda endojen yolla transfüzyon yapmadan profilaksi yapmakla eşdeğerdir. Gen tedavisi viral geçişler açısından emin

gözükse de viral replikasyonlar yoluyla etkili olması nedeniyle potansiyel olarak riskler taşımaktadır (41,42).

Dünyadaki hemofiliklerin % 80'e yakınının çok az tedavi edilebildiği hatta tedavi edilemediği bilinmektedir. Geçmişte ve günümüzde kan ürünlerinin viral hastalıkları nakletmesi, gen nakli için çalışmaları hızlandırmıştır. Oysa gelecek için gen nakli özellikle kan ürünü teknolojisine sahip olmayan ve bu ürünleri pahalılığı nedeniyle almakta zorlanan gelişmekte olan ülkeler için iyi bir yaklaşım olabilir. Çünkü bu tedavi kısmen veya tamamen kür elde etmeye yöneliktir. Ancak hasta erkeklerin, kız kardeşlerinde bozuk genin taşınmaya devam ettiği ve bunlar için prenatal tanının gerektiği unutulmamalıdır. Bugün gen nakli rutin olarak kullanılmamaktadır. Bu konudaki çalışmaları Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Hemofili Federasyonu (WFH) geniş ölçüde desteklemektedir. Gen naklinin başarılması hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelere büyük yarar sağlayacaktır (8,43).

Hemofililerin kesin tedavisi gen tedavisi ile mümkün olabilecektir. Şimdiye dek gen tedavisinde farklı yöntemler uygulanmıştır. Buların arasında değişik hayvan modellerinde viral vektörler (rAAV rekombinant Adeno associated Virus veya Retroviral vektörler) kullanılarak hücrelerin transfekte edilmesi; mikrokapsüller içinde rekombinant hücrelerin kullanılması; ve RNA / DNA oligonükleotidlerin "site-directed mutagenesis" için kan dolaşımına verilmesi gibi yöntemler sayılabilir (42,43). Viral vektörler kullanılarak hücrelerin transfekte edilmesinde karşılaşılan zorluk vektörün Faktör VIII cDNA'sının vektöre sığmamasıdır. Bunun için daha çok Faktör IX cDNA'sı veya B bölgesi çıkarılmış Faktör VIII cDNA'sı kullanılmıştır. Viral vektörlerin kullanımı ile Faktör IX düzeyinin normal seviyede sentezlenmesi sıçan, fare ve köpeklerde mümkün olmuştur. Eğer Faktör IX veya Faktör VIII anlatımının sürekliliği sağlanır ve immunolojik cevap azaltılabilirse gen tedavisinin insanlarda da klinik uygulamaya girmesi mümkün olacaktır (8,41).

B.) HASTALAR VE YÖNTEM

B.1.) HASTALAR

Hemofili A tanısı konan 44 erkek hasta ve sağlıklı 30 erkek bireyin periferik kan lenfositlerinden DNA elde edilmiştir (İzolasyon 37 hasta ve 30 sağlıklı bireyin EDTA'lı, 7 hastanın sitratlı tüpe alınan kan örneklerinde yapılmıştır).

B.1.1.) Çalışmada kullanılan kimyasal malzeme ve enzimler:

a) DNA izolasyonu

<u>Nüklei Lizis tamponu</u>	10mM Tris	1.21 gr
	400 mM NaCl	23.4 gr
	2 mM Na ₂ EDTA	0.74 gr

*pH: 8.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda steril edilir ve +4°C'de saklanır.

<u>%10 SDS solüsyonu</u>	SDS	10 gr
	dH ₂ O	90 ml

*pH: 7.2'ye ayarlanır, Whatman filtreden süzildükten sonra oda ısısında saklanır.

Proteinaz K

10 mg/ml olacak şekilde sulandırılır. Sulandırım firmaya göre değiştirilebilir. Burada 100 gr Sigma F-0390 kullanılmış ve deionize steril su ile sulandırım yapılmıştır.

Amonyum Asetat

74 gr amonyum asetat 20 ml steril deiyonize su içinde çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır (9M). Whatman kağıdı ile süzildükten sonra kullanılır.

<u>TE Buffer</u>	10 mM Tris HCl	pH:7.4
	1 mM Na ₂ EDTA	pH:8

* Otoklavda sterilizasyon.

b) DNA amplifikasyonu

DNA Taq polimeraz ve tampon (MBI- Fermentase)

100 mM Tris HCL (pH: 8.8-25 ° de)

500 mM KCL

%0.8 Nonidet P40

dNTP karışımı (MBI- Fermentase)

20 mM dATP

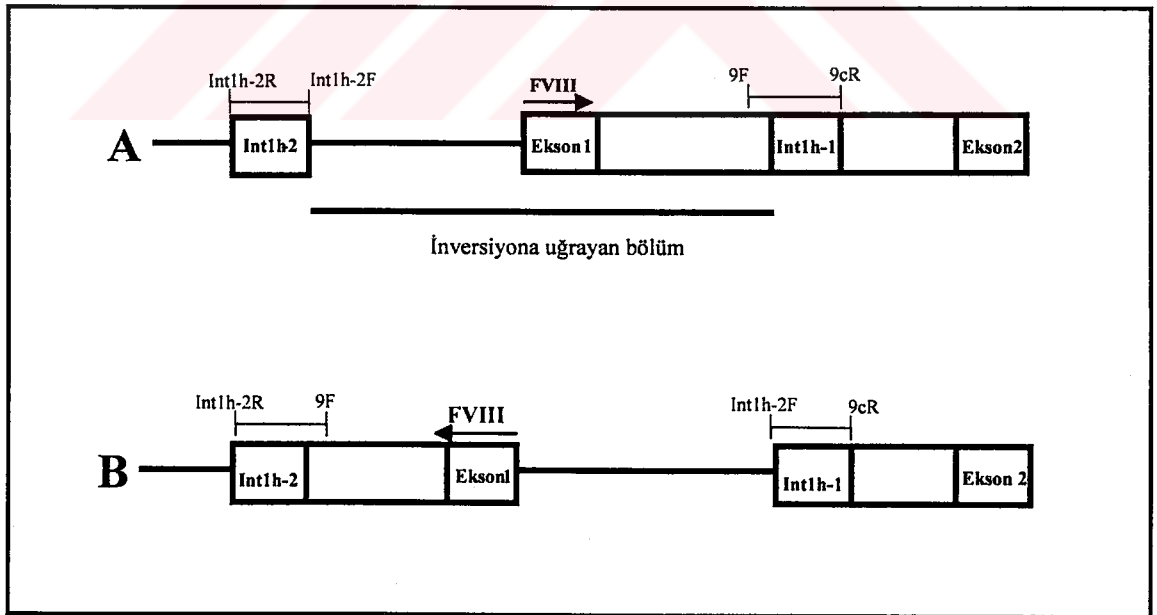
20 mM d GTP

20 mM dCTP

20 mM dTTP

İntron 1 primer dizisi (9,44)

I- 9F	5' gTT gTT ggg AAT ggT TAC gg 3'
II- 9cR	5' CTA gCT TgA gCT CCC TgT gg 3'
III- Int1h-2F	5' ggC Agg gAT CTT gTT ggT AAA 3'



Tablo.2 : Intron 1 bölgesinin amplifikasyonda kullanılan primerlerin yerleşimi

A: PCR için 9F, 9cR ve Int1h-2F primerleri; normal bir intronu göstermektedir.

B: Mutasyonlu bir geni; 9cR primerinin yeri mutasyonda da sabit kalmakta ancak 9F ve Int1h-2F değişimli olarak reaksiyona girmekte ve bu durumda normal intronda amplifikat yaklaşık 500 bp daha büyük olmaktadır.

SMN geni ekzon 7 –intron 6 primer dizisi i(45)

- I- 5' AgA CTA TCA ACT TAA TTT CTg ATC A 3'
II- 5' CTT TCC TTC TTT TTG gAT TTT gTT T 3'

CA-13 primer dizisi (Thermo hybaid)(5)

- Intron 13 F 5' TgC ATC ACT gTA CAT ATg TAT CTT 3'
Intron 13 F 5' CAA AAT TAC ATA TgA ATA AgC 3'

- Primerler stok olarak 100 pmol / µl olacak şekilde sulandırılmış ve 25 µl'lik amplifikasyonda 2 pmol / µl kullanılmıştır.

c) Agaroz Jel Elektrofözezi

Tris-asetat tampon (pH : 8):

Tris baz	40 mM
EDTA	1 mM
Asetik asit	1.1 ml

Yükleme Tamponu

Gliserol	55 ml
1XTAE tampon	45 ml
Orange G	0.1 gr

Agaroz (Sigma A-5093)

Ethidium bromür(Merck)

10 mg / ml olacak şekilde deionize su ile sulandırılarak kullanıldı.

DNA marker

- 1.)Ø X 174 / Hae III; 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp (Fermentas)
- 2.)50 bp DNA Ladder; 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp (Fermentas SM0618)
- 3.)Mass Ruler; 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 2500, 2000, 1500, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp (Fermentas SM0408)

d) Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Tris borat tampon (20 X TBE, pH : 8.3)

Tris baz	1.8 mM
Borik asit	1.8 mM
EDTA	50 mM

Amonyum persülfat (% 25)

Amonyum persülfat	25 mg
Distile su	1 ml

Jel hazırlanması

Akrilamid-bisakrilamid

(19 :1) % 40	17 ml
5XTBE	5 ml
Üre	28.5 gr
Amonyum persülfat	180 µl
Temed	35 µl
Distile su	~ 25 ml

Yükleme tamponu

Deiyonize formamid	%95
Ksilen siyanal	% 0.3
Brom fenol mavisi	% 0.3
Na ₂ EDTA	%0.37

e) Gümüş Boyama

Solüsyon 1

% 10 etanol
% 0.5 glacial asetik asit

Solüsyon 2

% 0.1 AgNO₃

Solüsyon 3

% 0.1 NaOH
% 1 formaldehit

Solüsyon 4

% 0.75 Na₂CO₃

*Solüsyon 2 dışında hepsi taze hazırlanır.

B.2.)YÖNTEMLER:

a) DNA İzolasyonu

Klinik olarak Hemofili A tanısı konan hastalar ve sağlıklı kontrollerden EDTA'lı tüpte alınan periferik kan lökositlerinden tuzla çöktürme yöntemine göre (300 µl kandan) DNA izolasyonları yapıldı. Sitratlı tüplere alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu için

tuzla çöktürme yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Sitratlı tüpte paketlenen kan hücreleri üzerine 1ml serum fizyolojik konarak 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Açılmayan hücrelere 500 µl dH₂O konarak tekrar 1 gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tuzla çöktürme yöntemi ile DNA'lar izole edildi (46).

b) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); DNA üzerinde incelenmesi istenen bölgenin yapay olarak hazırlanmış oligonükleotit primerler kullanılarak çoğaltılmasıdır. Bu yöntemle: denatürasyon ile çift zincirin birbirinden ayrılması, oligonükleotitlerin denatüre edilerek ayrılmış olan DNA zincirlerine bağlanması (annealing) ve hedef bölgeye karşılık gelen zincirin DNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenmesi (extension) şeklinde 3 temel aşama yer almaktadır. Bu aşamalar bir döngü olarak kabul edilir ve ortalama 25-35 döngü uygulanır (47). Çalışmada kullanılan amplifikasyonlardaki primer konsantrasyonu 2 pmol, Taq polimeraz 1,5 U / 25 µl'dir (DNA thermal cycler - Appligene Crocodile III). İntron 1 bölgesinin amplifikasyonu için primer bağlanma derecesi 55°C ve 35 döngü ile oluşan PCR ürünleri %1 ve %2 agarozda analiz edilirken, SMN geni için primer bağlanması 58°C'de ve PCR kontrolü %2.5 agaroz ile, intron 13 bölgesinin PCR kontrolü %3 elektroforezde değerlendirilmiştir (Tablo 3) (47).

TABLO 3: İNTRON 13 CA BÖLGESİNİN AMPLİFİKASYON KOŞULLARI	
PCR bağlanma sıcaklığı	55°C
MgCL ₂	1,5 mM
PCR döngü sayısı	30
Akrilamid konsantrasyonu	%12
Jel özelliği	Denatüre
Jel boyutu	26,5x18
Elektroforez koşulları	250 V 4,5 saat
* Denatürasyonda üre kullanılmıştır.	

c) Dinükleotit tekrarlarının analizi

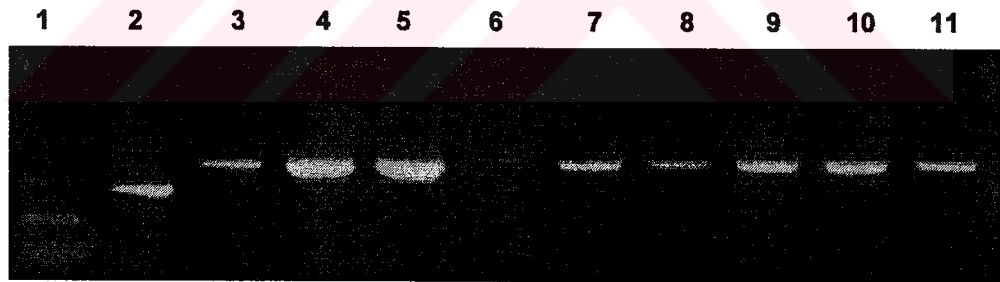
Dinükleotit tekrar bölgesinin amplifikasyon ürünleri 5 dakika 100 C' de denatüre edilip %12'lik poliakrilamid jele yüklenmiş ve elektroforezi yapılmıştır.

Dinükleotit tekrarların analizinde elektroforezden sonra gümüş nitrat boyama yöntemi kullanılmıştır. Boyanan jeller alttan beyaz ışık verilerek 25 ASA'lık siyah beyaz filme alınmış ve karta basılmıştır (45,47,48).



C.) BULGULAR

Aralarında akrabalık olmayan 44 Hemofili hastasında (ağır form 30, orta form 11, hafif form 3); Faktör VIII geninde yer alan intron 1 bölgesindeki inversiyon tipi mutasyonunun bulunup-bulunmadığı araştırılmıştır. Kırkdört hastanın 9'unda (%20.4) inhibitör, 35 (%79.5) hastada da artropati saptanmıştır. Tüm hastaların 19'unda (%43.1) aile öyküsü belirlenememiştir. Hastaların klinik özellikleri Tablo 4'te verilmiştir. Bu analize ait fotoğraflar Şekil 4 ve 5'de gösterilmiştir. EDTA ve sitratlı tüpe alınan periferik kandan izole edilen DNA'lar arasında PCR reaksiyonları açısından bir farklılık gözlenmemiştir. Hemofili A hastalarının iki tanesinde amplifikasyon gözlenmez (en az 3 kez tekrarlanarak kontrol edilmiş) iken kontrol DNA'larının tümünde amplifikasyon olmuştur (Şekil 6).



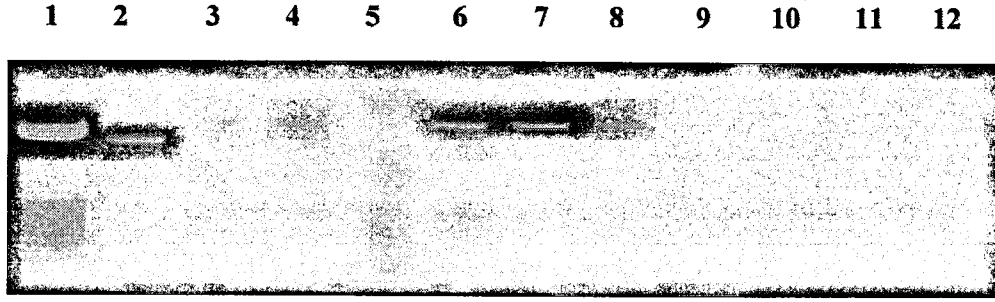
Şekil 4: Faktör VIII geninin 1. intronundaki inversiyon tipi mutasyonun analizi

- | | |
|------|--|
| 1 | → QX174 / Hae III Marker |
| 2 | → İnversiyon tipi mutasyonu bulunan Hemofili A hastasına ait PCR ürünü |
| 3-11 | → 1-3,21,5-9 nolu Hemofili A hastalarına ait PCR ürünleri |

Tablo 4: Hastaların Klinik Özellikleri

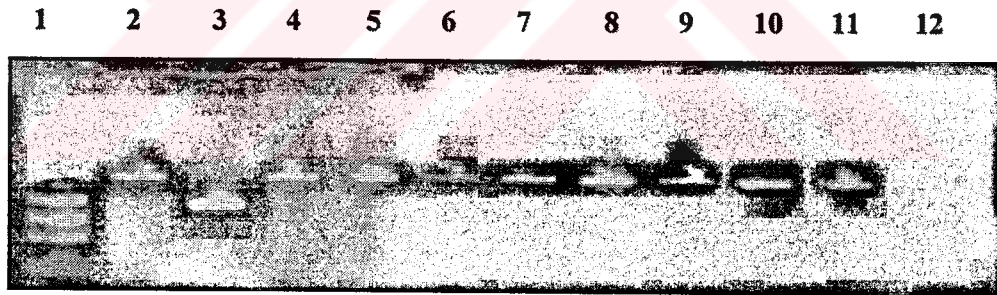
No	AS	YAŞ	HEMOFİLİ FORMU*	% F VIII	İNHİBİTÖR	ARTROPATİ	AİLE ÖYKÜSÜ
1	GH	47	Hafif	7	0	1	1
2	HÖ	28	Ağır	1	0	1	0
3	MK	30	Orta	2.1	1	1	0
4	Yİ	24	Ağır	1	0	1	1
5	HT	48	Ağır	0	0	1	1
6	ÜS	21	Ağır	1.5	0	1	0
7	RÇ	44	Ağır	0	0	1	1
8	ÖU	18	Orta	3	0	0	0
9	FA	24	Ağır	0	0	1	1
10	HH	54	Ağır	0	0	1	1
11	DE	42	Ağır	1.4	0	1	0
12	İB	31	Ağır	1.5	0	1	1
13	TV	24	Ağır	1	1	1	1
14	NT	36	Ağır	1	0	1	1
15	CG	21	Ağır	1	1	1	1
16	İG	29	Ağır	1	1	1	1
17	EK	28	Ağır	0	1	1	0
18	ÖÖ	28	Ağır	1	0	1	0
19	CMT [#]	23	Ağır	1	0	1	1
20	EB ^{&}	33	Orta	4	0	1	1
21	İK	35	Ağır	1	0	1	0
22	ZA	44	Hafif	10.7	0	0	0
23	SHE	51	Orta	2.5	0	1	1
24	MÖ	35	Ağır	0	1	1	1
25	GA	26	Hafif	25	0	0	0
26	SK	39	Orta	2.1	0	1	0
27	HÖ	51	Orta	4	0	0	0
28	AS	24	Ağır	1.5	0	1	0
29	İG	33	Ağır	1.2	0	1	0
30	AÖ	14	Ağır	1	0	1	0
31	NS	45	Ağır	1	0	1	1
32	AD	58	Orta	4	0	0	0
33	BB [¶]	7	Ağır	1	0	1	1
34	ÖÇ	16	Ağır	1.5	0	1	1
35	RC	17	Orta	4.5	0	0	1
36	RA	38	Ağır	1	0	1	0
37	VY	22	Ağır	1.5	0	1	1
38	OB	26	Orta	4.4	1	1	0
39	VA	39	Ağır	1.5	1	1	1
40	VT	14	Ağır	1.5	0	1	1
41	TB	5	Ağır	1	0	0	0
42	KG	12	Orta	5	0	0	1
43	MG	21	Orta	4	0	0	1
44	MK [§]	3	Ağır	1	1	1	1

* Faktör VIII; Ağır Hemofili A<2, Orta Hemofili A %2-5, Hafif Hemofili A >5
 # İntron 1 bölgesinin de dahil olduğu bir delesyon indirekt saptanmıştır.
 & İntron 13 bölgesinin de dahil olduğu bir delesyon indirekt saptanmıştır.
 ¶ İntron 22 inversiyonu belirlenmiştir.
 § Hem intron 1 hem de intron 13 bölgesinin bulunduğu büyük bir delesyon indirekt saptanmıştır.



Şekil 5: Faktör VIII geninin 1. intronundaki inversiyon tipi mutasyonun analizi

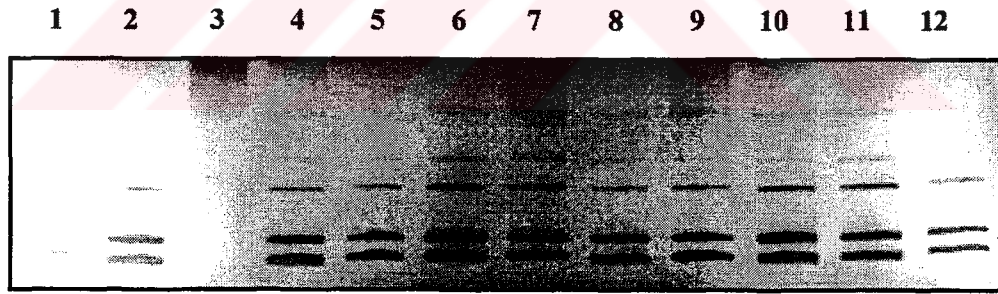
- | | |
|---------------|---|
| 1 | → 50 bp DNA Marker |
| 2 | → İnversiyon tipi mutasyonu bulunan erkek Hemofili A hastasına ait PCR ürünü |
| 3,4,6-8,11,12 | → 10,12,13,39,35,45,36 nolu Hemofili A hastalarına ait PCR ürünleri |
| 9 | → Negatif Kontrol (PCR'da kontaminasyon olmadığına dair kontrol) |
| 5,10 | → DNA izole edilmesine rağmen amplifikasyon gözlenmeyen 42 ve 19 nolu Hemofili A hastalarına ait PCR ürünleri |



Şekil 6: Kontrol grubuna ait erkek bireylerin DNA örneklerinde Faktör VIII geni intron 1 bölgesindeki inversiyon tipi mutasyon analizi.

- | | |
|--------|--|
| 1 | → QX174 / Hae III Marker |
| 2,4-11 | → Kontrol erkek bireylerin DNA'larına ait PCR ürünleri |
| 3 | → İnversiyon tipi mutasyonu bulunan erkek Hemofili A hastasına ait PCR ürünü |
| 12 | → Negatif Kontrol (PCR'da kontaminasyon olmadığına dair kontrol) |

Çalışılan Hemofili A hastalarının Faktör VIII geni intron 13 bölgesinde yer alan CA tekrar bölgesinin amplifikasyonu, 44 hasta örneğinin 41'inde yapılmış 3 tanesinde yapılamamıştır. Faktör VIII geni intron 1 bölgesinde amplifikasyonu gerçekleşmeyen 1 hastaya ait DNA örneği bu bölgede amplifiye olmuştur. Yirmi ve 33 nolu hastaların intron 1 bölgesinde amplifikasyonu gözlenmesine karşın bu bölgede en az 3 kez tekrarlanmasına rağmen gözlenmemiştir (Şekil 7). 33 nolu Hemofili A hastasının faktör VIII geninde intron 22 inversiyonu gözlenmiştir ve 13 nolu intronunda amplifiye edilemeyişi açıklığa kavuşturulmuştur. 44 nolu hastada ise hem 1. intron hem de 13. intron bölgesinde amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Otuz erkek DNA'sının amplifikasyonu yapıldığı kontrol grubunun tümünde amplifikasyon olmuştur (Şekil 8).



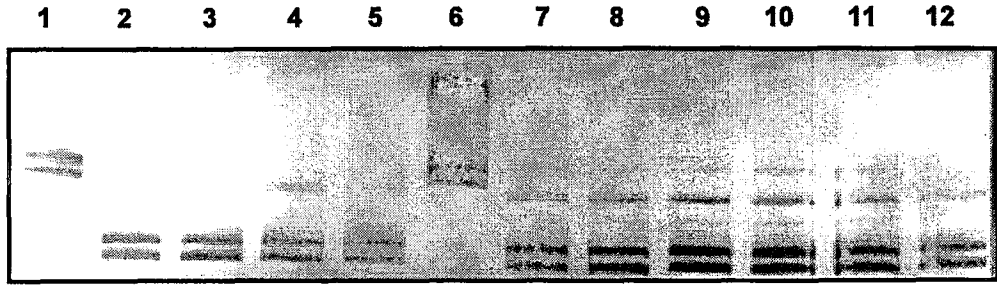
Şekil 7: Hemofili A hastalarında Faktör VIII geni 13. İntronundaki CA tekrarın analizi*

1,2,4-12 → Kontrol Hemofili DNA'sı ve 1, 2, 19, 42, 3-9 nolu hastalara ait PCR ürünleri

3 → H33 nolu hastaya ait PCR ürünü**

* Gümüş boyama ile yapılarak elde edilen %12 denatüre poliakrilamid jel

**İlgili bölge internal kontrollerle birlikte 3 kez amplifiye edilmiş fakat bir amplifikasyon ürünü alınamamıştır.



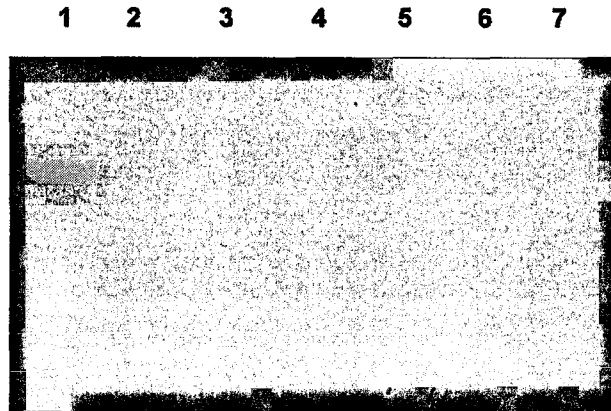
Şekil 8: Kontrol grubunda Faktör VIII geni 13. İntronundaki CA tekrarın analizi*

1,6 → QX174, Hae III marker

2-5,7-12 → Kontrol grubuna ait PCR ürünleri

* Gümüş boyama ile yapılarak elde edilen %12 denatüre poliakrilamid jel

Hem Faktör VIII geni 1. intronu hemde 13.intron bölgesinde PCR amplifikasyonu 3 kez tekrarlanmasına karşın gerçekleştirilemeyen 44 nolu Hemofili A hastasına ait DNA ve diğer 19,20, 33 hasta DNA'ları 5. kromozomda yer alan ve her hücrede bulunan Survival Motor Nöron Geni (SMN) 7 ekzonuna ait primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Her 4 hasta DNA'sında amplifikasyonu olduğu gösterilmiştir (Şekil 9).

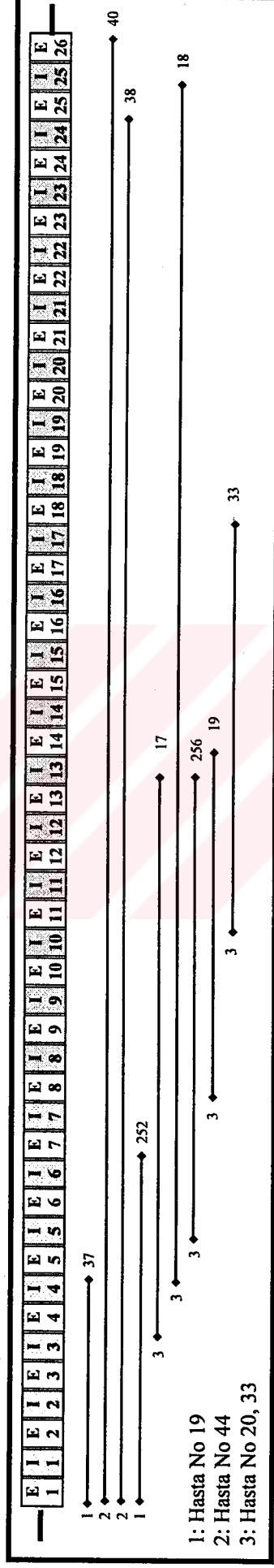


Şekil 9: SMN geni ekzon 7 analizi

1 → 50 bp marker

2-5 → 44, 21, 33, 42 nolu Hemofili A hasta DNA'larına ait PCR ürünleri

Şekil 10: Çalışılan hastalara ait Faktör VIII geninde yer alan olası delesyon bölgeleri
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=306700>)



D.) TARTIŞMA

İnsan DNA'sında bulunan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan kalıtsal değişimler, her hücrede sabit olarak bulunan DNA molekülünün moleküler biyolojik teknikler yardımıyla analizi sonucunda incelenebilmektedir. Hemofili A'ya neden olan Faktör VIII geni X kromozomunun 28. lokusun da bulunur. Yirmi altı ekzondan oluşan bu gende 280 civarında delesyon tipi mutasyon saptanmıştır. Mutasyonların hemen hemen kişiye özel olduğu gösterilmiştir (4).

Kanama sıklığı ve şiddeti faktör VIII, IX düzeyi ile doğru orantılıdır. Bir ailede etkilenen bireylerin eksiklik ve kanama dereceleri de benzer olma eğilimindedir. Plazmadaki normal faktör düzeyleri % 50-150 ünite arasında değişir. Faktör düzeyi %50'nin altında olduğu hastalarda ağır travmalar kanamalara neden olur. Faktör düzeyinin normalin %40'ın altında olmasına (0.05-0.4 IU/mL) Hafif tip hemofili denir. Genellikle sessiz seyreder ve erişkinlerde ağır travmalar ve cerrahi girişim sonrasında kanamalar görülür. Faktör düzeyi normalin %1-5 arasında ise (0.01-0.05 IU/mL) Orta tip hemofili, normalin %1'in altında ise (<0.01 IU/mL) Ağır hemofili denir (8,10).

Çalışmamızda; 44 Hemofili A hastasından alınan periferik kandan tuzla çöktürme yöntemine göre DNA izole edilmiştir. EDTA'lı tüpe alınan kanından 37 hastanın kanından ve sitratlı tüpe alınan 7 hastanın kanından DNA izolasyonu başarıyla yapılmıştır. Kan sayımı için alınan sitratlı tüplerinde yer alan kan hücrelerinin tuzda çöktürme yöntemi ile yapılan modifikasyon sonucunda DNA analizlerinde kullanılabileceği gözlenmiştir. Antikoagülan olarak kullanılan EDTA yada sitratlı tüpe alınan kandan izole edilen DNA'ların arasında bir farklılığın bulunmadığı çıkan PCR sonuçlarından da görülmüştür.

Faktör VIII geni 1.intronunda yer alan inversiyon tipi mutasyonun analizi İtalyan toplumundaki Hemofili A hastalığının ağır formunu bulunduran 21 hastada yapılan tarama sonucunda 1 hastada saptanmıştır (49). İngiliz toplumundaki Hemofili A'nın ağır formunu bulunduran 209 hastada yapılan mutasyon taraması sonucunda 10 tanesinin bu mutasyonu bulundurduğu tespit belirlenmiştir (44). Alman toplumundaki 1350 Hemofili A hastasında yapılan mutasyon taraması sonucunda 5 hastada bu mutasyon saptanmıştır (9). Çalışmamızda ise 44 Hemofili A hastasının (30 hasta ağır Hemofili A olmak üzere) bu bölgede inversiyon tipi bir mutasyon taşımadığı fakat 2 tanesinin Intron 1 bölgesini de içine alacak şekilde Faktör VIII gen bölgesinde delesyonu bulunabileceği belirlenmiştir. Hasta DNA'sının izole edildiği hem spektrofotometrik olarak ölçülerek hem de 5. kromozomun 13. lokusunda yer alan ve transkripsiyonda anahtar rolü olan Survival Motor Nöron (SMN) genine ait bölgenin amplikasyonu ile tespit edilmiştir. Ayrıca çalışılan 44 Hemofili A hastasına ait DNA'lar 13. introndaki CA-tekrar dizi bölgesi analiz edilerek incelendiğinde, Intron 13'de amplifikasyonu olmayan 1 örneğin intron 13'de amplifiye olduğu belirlenmiştir (Şekil 7). Bu hastanın intron 1'in de içinde olduğu bir delesyona sahip olacağı düşünülmüş ve literatür taranmıştır. Hugichi ve arkadaşlarının Ekzon 1 ve 5 arasında, 35 kb'lık bir mutasyonu bildirdikleri, Millar ve arkadaşlarının da ekzon 1 ve 6 arasında bir delesyon tipi mutasyonun varlığı bildirmişlerdir (50,51). Hastamızın bu mutasyonlara yada yeni saptanacak bir mutasyonu bulundurup-bulundurmadığının analizi için çalışmalara başlanmıştır (Şekil 9).

Hem Faktör VIII geni intron 1 hem de intron 13 bölgesinde amplifiye olmayan ama SMN geni 7.ekzonu bölgesinde ise amplifiye olan 44 nolu Hemofili A hastasının; hem intron 1 hem de intron13'ü içeren bir delesyonu olduğu düşünülmüştür (Şekil 9). Literatüre bakıldığında; Lillicrap ve arkadaşlarının ekzon 1-22 arasında 127 kb'lık bir delesyonu,

Casarino ve arkadaşlarının ekzon 1-26 arasında 178 kb'lık bir delesyonu bildirdikleri görülmüştür (51,52). Biz de 44 nolu hastanın delesyon boyutunu araştırmayı planladık ve hasta muhtemelen bu delesyondan birini ya da daha tanımlanmamış bir delesyon tipi mutasyon bulundurmaktadır.

Hem Faktör VIII geni intron 1 hem de SMN ekzon 7 amplifikasyonu olan ama F8 genini 13. intronunda amplifikasyon gözlenmeyen 2 hasta için literatür gözden geçirildiğinde an az 6 farklı delesyon tipi mutasyonun bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 9) (16,51,52,53,54). Hastalardan bir tanesinin (Hasta No 33) Intron 22 inversiyonunun bulunduğu belirlenmiş ve diğer hasta ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışma ile sonuç olarak;

1. EDTA'lı tüpe alınan periferik kandan değil sitratlı tübe alınan kan örneklerinden de DNA'ların sağlıklı bir şekilde izolasyonu gerçekleştirilmiş ve rutin çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır.
2. Aralarında akrabalık olmayan 44 Türk hemofili A hastasında (30 ağır form, 11 orta form ve 3 hafif form olmak üzere) Faktör VIII geninin 1. intronunda inversiyon tipi mutasyonun bulunmadığı gösterilmiştir.
3. 44 hemofili hastasının 4 tanesinde ise Faktör VIII geninde büyük delesyonların bulunabileceği gösterilmiş ve indirekt belirlediğimiz bu bölgeden 33 nolu hastada Intron 22 inversiyonunun belirlenmesiyle sonuçlarımızı doğrulamıştır. Bir tanesi hem 1. hem de 13. intronu içeren bir delesyon, bir tanesi 1. intronu içeren delesyon ve 2 tanesinin de intron 13 bölgesini içeren bir delesyonu bulunduğu indirekt olarak gösterilmiş ve diğer 35 DNA örneğinde daha ayrıntılı araştırmalara başlanmıştır.

E.) TÜRKÇE ÖZET

Hemofili A, X kromozomuna bağlı resesif geçiş gösteren ve koagülasyon faktörü VIII'in aktivite eksikliği sonucu oluşan bir kanama bozukluğudur. Xq28 bölgesinde yer alan Faktör VIII geninde yaklaşık olarak 280 farklı mutasyonun bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, aralarında akrabalık olmayan 44 Türk Hemofili A hastasında (ağır form 30, orta form 11, hafif form 3); Faktör VIII geninde yer alan İntron 1 bölgesindeki inversiyon tipi mutasyonunun bulunup-bulunmadığı araştırılmıştır. Kırkdört hastanın 9'unda (%20.4) inhibitör saptanırken, 25 (%56.8) hastada aile öyküsü belirlenmiştir. EDTA'lı tüpe alınan 37 hasta ile sitratlı tüpe alınan 7 hastaya ait periferik kandan tuzla çöktürme yöntemiyle DNA izole edilmiştir. Faktör VIII geninin 1. intronundaki mutasyonunu belirleyecek şekilde düzenlenmiş primerler (9F, 9cR, Int1h-2F, Int1h-2R) ile ilgili bölge PCR yardımıyla hem hastalarda hem de hemofili olmayan 30 erkek DNA'sında (kontrol grubu) çoğaltılmış (55°C annealing, 35 döngü) ve %2 agaroz jel elektroforezinde yürütülerek değerlendirilmiştir. Hemofili A hastalara ve kontrol grubuna ait DNA'lar kullanılarak Faktör VIII geni 13. intronundaki mikrosatellit bölgesine (Int13F ve Int13R) ve 5. kromozomda yer alan Survival Motor Nöron (SMN) genine (SMN7F ve SMN7R) ait primerler kullanılarak amplifiye (içsel kontrol olarak) edilmişlerdir. Sonuç olarak; a) Her zaman laboratuarda kullanılan EDTA'lı kandan DNA izolasyonu ile birlikte sitratlı tüpe alınan kandan da DNA izole edilip kullanılabileceği (modifiye ettiğimiz tuzla çöktürme yöntemi ile) gösterilmiş ve rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. b) Aralarında akrabalık olmayan 44 Hemofili A hastasına ait DNA örneklerinde Faktör VIII geninin 1. İntronunda bir mutasyonun olmadığı belirlenmiştir. c) Faktör VIII geninin 1. İntronunda inversiyon tipi mutasyon saptanmamasına karşın 1 hastada bu bölgenin de içinde yer aldığı en az 2 farklı mutasyonun bulunabileceği indirekt yolla belirlenmiştir. İki hastada İntron 13 bölgesinde amplifikasyon gözlenmezken, bir hastada hem İntron 1 hem de İntron 13 bölgesinde amplifikasyon gözlenmemiş ve örneklerin tümünde içsel kontrol olarak kullanılan SMN geni 7. ekzonunda amplifikasyon gerçekleşmiştir. Faktör VIII geni İntron 1 bölgesinde ve SMN geni Ekzon 7 bölgesinde amplifikasyon olan ama Faktör VIII geni İntron 13 bölgesinde amplifikasyon gözlenmeyen 2 hasta DNA'sından bir tanesinde İntron 22 inversiyonu var iken diğerinde indirekt olarak bu bölgede bir mutasyonun olabileceği belirlenmiştir.

F.) İNGİLİZCE ÖZET

Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene in Turkish hemophilia A patients.

Hemophilia A (HA) is an X-linked bleeding disorder caused by a deficiency in the activity of coagulation factor VIII (FVIII) gene. Approximately 280 different mutations (deletion type) has been identified in the factor VIII gene, which maps to Xq28 locus.

In this study we have undertaken to identify the inversion involving intron 1 of the FVIII gene in the 44 unrelated Turkish patients (severe 30, moderate 11, mild 3). In 9 patients (%20.4) inhibitor positivity and family-history in 25 (%56) patients were determined. DNAs are isolated from EDTA-anticoagulated (37 patients) and citrate peripheral blood samples (7 patients) using salting-out procedure. In order to detection of intron 1 of the FVIII gene, designed primers (9F, 9cR, Int 1h-2F, Int 1h-2R) used to amplify both hemophilia A patients and the 30 non-hemophilia A male and final amplification products were analysed on a %2 agarose gel electrophoresis. Hemophilia patients and control group DNA amplified (as a kontrol) by specific primers designed for microsatellite region the intron 13 of the factor VIII gene and Survival Motor Neuron (SMN) gene, which are located in chromosome 5q.

In conclusion addition to DNA extraction from the blood with EDTA, indicated that DNA extraction could be done from blood with citrate (with modify salt-out procedure) and this method can be use routine. In 44 unrelated hemophilia patients, no mutation was determined at intron 1 of factor VIII gene. Three patients have determined by indirect mutation and the one of those patients has intron 22 inversion.

G.) KAYNAKLAR

1. Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, et al. Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1993; 4: 313-344.
2. Tuddenham EG, Schwaab R, Seehafer J, et al. Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition. *Nucleic Acids Res*, 1994; 22: 3511-3533.
3. Kangsadalampai S, Coggan M, Caglayan SH, et al. Application of HUMF13A01 (AAAG)_n STR polymorphism to the genetic diagnosis of coagulation factor XIII deficiency. *Thromb Haemost*, 1996; 76: 879-882.
4. Omim (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=306700>)
5. Jarjanazi H, Timur AA, El-Maari O and Caglayan SH. Analysis of the two microsatellite repeat polymorphisms of the factor VIII gene in the Turkish population. *Br J Haematol*, 1998; 100: 589-593.
6. Jarjanazi H, Timur AA, El-Maarri O, Caglayan SH. Intron 22 inversions in the Turkish haemophilia A patients: prevalence and haplotype analysis. *Haemophilia*, 1999; 5 :169-73.
7. Gitschier J. The Molecular Basis of Hemophilia A. *Am NY Acad Sci*, 1991; 614: 89-96.

8. Bolton-Maggs PHB and Pasl RJ. Hemophilias A and B. *Lancet*, 2003; 361: 1801-1808.
9. Uen C, Oldenburg J, Schroder J, et al. 2% Haemophilia A patients without mutation in the FVIII gene. *Hamostaseologie*, 2003 ;23 :1-5.
10. Thompson A. Molecular Biology of Hemophilias. *Progress Haemos Thromb*, 1991; 10: 175-214.
11. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 1984; 312: 326-330.
12. Bithell TC. Hereditary Coagulation Disorders. *Wintrobe's Clinical Haematology* 10th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
13. Connor M, Ferguson-Smith M. *Essential Medical Genetics*. Fifth ed. Blackwell Science, London, 1997.
14. Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, Savidge GF. The identification and classification of 41 novel mutations in the factor VIII gene (F8C). *Hum Mutat*, 2002; 19: 274-278.
15. Gitschier J, Wood WI, Tuddenham EG, et al. Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of haemophiliacs. *Nature*, 1985; 315: 427-430.
16. Antonarakis SE, Waber PG, Kittur SD, et al. Hemophilia A. Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N Engl J Med*, 1985; 313: 842-848.

17. Ahrens P, Kruse TA, Schwartz M, et al. A New Hind III Restriction Fragment Length Polymorphism in the Hemophilia A Locus. *Human Genetics*, 1997; 76: 127-128.
18. Youssoufian H, Phillips DG, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE. MspI polymorphism in the 3' flanking region of the human factor VIII gene. *Nucleic Acids Res*, 1987; 15: 6312.
19. Oberle I, Drayna D, Camerino G, et al. The telomeric region of the human X chromosome long arm: presence of a highly polymorphic DNA marker and analysis of recombination frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985; 82: 2824-2828.
20. Waseem NH, Bagnaall R, Green PM, Gianelli F. Mutation detection in factor VIII cDNA from lymphocytes of hemophilia A patients by solid phase fluorescent chemical cleavage of mismatch. *Methods Mol Biol*, 2002; 187: 109-123.
21. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood*, 1998; 92: 1458-1459.
22. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989; 5: 874-879.
23. Waseem NH, Bagnall R, Green PM, Gianelli F. Start of UK confidential haemophilia A database: analysis of 142 patients by solid phase fluorescent chemical cleavage of mismatch, Haemophilia Centres. *Tromb Haemost*, 1999; 81: 900-905.

24. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS. Williams Hematology. Sixth ed. McGraw-Hill, 2001.
25. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, et al. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992; 89: 2804-2808.
26. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of thy-1 on human hemotopoietic progenitor cells. *J Exp Med*, 1993; 177: 1331-1334.
27. Hollestelle MJ, Thinnes T, Crain K, et al. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look. *Thromb Haemost*, 2001; 86: 855-861.
28. Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, et al. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics*, 1990; 7: 1-11.
29. Naylor J, Brinke A, Hassock S, et al. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet*, 1993; 2: 1773-1778.
30. Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, et al. Prevalence of small rearrangements in the factor VIII gene F8C among patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat*, 2002; 20: 236-237.

31. Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, et al. Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematol*, 1994; 86: 804-809.
32. Schwaab R, Oldenburg J, Lalloz MR, et al. Factor VIII gene mutations found by a comparative study of SSCP, DGGE and CMC and their analysis on a molecular model of factor VIII protein. *Hum Genet*, 1997; 101: 323-332.
33. Bagnall RD, Waseem NH, Green PM, et al. Creation of a novel donor splice site in intron 1 of the factor VIII gene leads to activation of a 191 bp cryptic exon in two haemophilia A patients. *Br J Haematol*, 1999; 107: 766-771.
34. Wacey AI, Kemball-Cook G, Kazazian HH, et al. The haemophilia A mutation search test and resource site, home page of factor VIII mutation database: HAMSTeRS. *Nucleic Acids Res*, 1996; 24: 100-102.
35. Ellis TP, Humprey KE, Smith MJ, Cotton RG. Chemical cleavage of mismatch; a new look at an established method. *Hum Mut*, 1998; 11: 345-353.
36. Dale JW and von Schantz M. *From Genes To Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology*. Wiley and Sons Ltd. UK, 2002.
37. Cotton RG, Rodrigues NR, Campbell RD. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988; 85: 4397-4401.

38. Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS. Dideoxy fingerprinting (ddE): a rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics*, 1992; 13: 441-443.
39. Myers RM, Larin Z, Maniatis T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science*, 1985; 230: 1242-1246.
40. Fischer SG, Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, 1979; 16: 191-200.
41. White SJ, Page SM, Margaritis P, Brownlee GG. Long-term expression of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes in vivo. *Hum Gene Ther*, 1998; 9: 1187-1195.
42. Chang TM, Prakash S. Therapeutic uses of microencapsulated genetically engineered cells. *Mol Med Today*, 1998; 4: 221-227.
43. Kren BT, Bandyopadhyay, Steer CJ. In vivo Site Directed Mutagenesis of the Factor IX gene by Chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nature Med*, 1998; 4: 285-290.
44. Bagnall RD, Waseem N, Green PM and Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*, 2002; 99: 168-174.
45. Pehlivan S. Spinal Musküler Atrofi aday genlerinde delesyon ve CA-tekrar analizleri, Doktora Tezi, Hacettepe Tıp Fakültesi, 1997.

46. Miller SA and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleates cells Nucleic Acid Res, 1988; 28: 1215.
47. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1983.
48. Erdem H, Pehlivan S, Topaloğlu H, et al. Allele distribution of D5S125, MAP1B5' and D5S679 microsatellite markers in Turkish Spinal Muscular Atrophy Families. Turkish J Paediat, 1997; 2: 447-452.
49. Riccardi F, Tagliaferri A, Manotti C, et al. Intron 1 factor VIII gene inversion in a population of Italian hemophilia A patients. Blood, 2002; 100: 3432- .
50. Higuchi M, Kochhan L, Schwaab R, et al. Molecular defects in hemophilia A: identification and characterization of mutations in the factor VIII gene and family analysis. Blood, 1989; 74: 1045-1051.
51. Millar DS, Steinbrecher RA, Wieland K, et al. The molecular genetic analysis of hemophilia A: characterization of six partial deletions in the factor VIII gene. Hum Genet, 1990; 86: 219-227.
52. Youssoufian H, Antonarakis SE, Bell W, et al. Nonsense and missense mutations in hemophilia A: estimate of the relative mutation rate at CG dinucleotides. Am J Hum Genet, 1988; 42: 718-725.
53. Youssoufian H, Antonarakis SE, Kasper CK et al. The spectrum and origin of mutations in hemophilia A. J Hum Genet, 1987; 41; A249.
54. Lillicrap DP, Taylor SAM, Grover H et al. Genetic analysis in Hemophilia A: identification of large F.VIII gene deletion in a patient with high titre antibodies to human and porcine F.VIII. Blood, 1986; 68; 337a.