

# Hemofili Moleküler Genetiği

Dr. S. Hande ÇAĞLAYAN

Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul

**H**emofili kan pıhtılaşmasında rol alan proteinlerden Faktör VIII (FVIII) ve Faktör IX (FIX)'dan birinin eksikliği veya bozukluğu ile ortaya çıkan X kromozomuna bağlı resesif geçiş gösteren tek gene bağlı kalıtsal bir hastalıktır. Spontan veya çeşitli etkenler sonucu meydana gelen kanamaların sıklığı hastalığın klinik şiddetini (fenotipini) ağır, orta veya hafif hemofili olarak belirler. Hemofilinin iki tipi vardır. Hemofili A, yaklaşık her 5000 erkek doğumda rastlanan faktör VIII (FVIII) eksikliği veya bozukluğu, hemofili B ise yaklaşık her 10,000 erkek doğumda rastlanan faktör IX (FIX) eksikliği veya bozukluğudur. Her iki faktörü kodlayan genlerin X kromozomu üzerine haritalanması ve DNA dizisinin çıkarılması 1984/85 yıllarına rastlar. Özellikle FVIII'in büyük ve karmaşık genlerden biri olmasına rağmen haritalanması ve ekzon dizilerinin bilinmesi sayesinde bu genler moleküler patolojisi sıklıkla çalışılan ve DNA analizine dayalı tanı yöntemlerinin ilk uygulandığı genler arasındadır. Hemofilinin dişilerde görülmesi X-inaktivasyonuna veya nadiren iki defektif allelin kalıtılmasına bağlıdır. Hastalığın genotipi FVIII ve FIX genlerinde meydana gelen mutasyonların saptanması ile belirlenir. Hastalığın oluşumu 1/3 oranında sporadik olarak görülür. Bu durumda mutasyon annenin gametlerinden birinde oluşmuştur. Ailede bir tek hasta birey vardır ve anne taşıyıcı değildir. Ailesel geçişli hemofilide ise hastalık ailede birden çok bireyde görülür ve hastanın annesi taşıyıcı durumdadır (1).

Hastaların yaklaşık % 15-25'inde FVIII aktivitesini düşüren antikorlar oluşur. Bu oran hemofili B'de %4-5'dir. Nadiren CRMred veya CRM+ hastalarda görülür (low responders). Genellikle CRM- hastalarda büyük delesyon veya anlamsız

mutasyon taşıyanlarda görülür (high responders). Ancak, inhibitörlerin oluşumu sadece mutasyon tipine değil aynı zamanda MHC antijenlerinde de bağlıdır. FVIII'in A2, A3 ve C2 bölgesindeki epitoplara antikor oluşumunda önemlidir. İnhibitor oluşumu replasman tedavisinde olduğu kadar gen tedavisi protokolleri içinde önemli bir sorun oluşturur (2).

1984'den beri yaklaşık 2500 hemofili A hastasında hemofilinin moleküler temeli gen yapısı düzeyinde incelenmiştir ve mutasyonlar sürekli güncellenen bir veritabanında tutulmaktadır (<http://europium.mrc.rpms.ac.uk>). Hemofili A veritabanında 821 hasta girişi vardır. Bunlardan 43 tanesi Türk hastalarında saptanan mutasyonlardır. Hemofili B veritabanında (<http://www.umds.ac.uk/molgen/haemBdatabase.htm>) ise 2511 hasta girişinden 44 tanesi Türk hastalarına aittir.

## Amaç

Hemofilide genetik çalışmaların amaçlarını hastalığa yol açan mutasyonları belirleyerek genotip/fenotip ilişkisini kurmak; hasta ailelerine genetik danışma sunmak için uygun DNA bağlantı analizi yöntemlerini belirlemek; hemofili mutasyonlarının profili çıkarmak için veritabanı oluşturmak; mutasyon profilinin farklı toplumlarda karşılaştırmalı analizini yapmak; mutasyon mekanizmalarını incelemek ve FVIII/FIX genlerini model sistemler olarak kullanarak bazı temel genetik kavramları açıklamak olarak sıralayabiliriz. Türkiye'de hemofili genetiği çalışmaları 1988/89 yıllarında Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ile Hacettepe ve Cerrahpaşa Tıp Fakülteleri Hematoloji Kliniklerinin ortaklaşa çalışması ile başlatılmıştır.

Hemofili genetiği çalışmaları için DNA örnekleri 10ml EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden elde edilmektedir. Kan örneklerinin tercihen bir gün içinde (sıcak havada buz içinde) DNA çıkarılacak merkeze ulaştırılması gerekmektedir. Kan örnekleri DNA çıkarılmadan saklanacaksa 40C de 1 hafta, -20°C de ise aylarca saklanabilir. DNA örnekleri ise yıllarca saklanabilir.

### **FVIII/FIX Gen Yapıları ve Mutasyon Belirleme Yöntemleri**

FVIII geni X kromozomunun uzun kolu üzerinde telomere 1Mb uzaklıkta Xq28 bölgesindedir. 186 kb DNA üzerinde 26 ezondan oluşur, mRNA'sı 9 Kb'dir. En büyük intron, 32.4 kb uzunluğunda olan intron 22'dir. Bu intronda görevi bilinmeyen 1.8 kb transkript yapan F8A geni bulunur. F8B geni aynı promotordan ters yönde ve FVIII ezon 23-26'yı da içine alarak sentezlenir. F8A'nın iki kopyası telomer ucuna doğru 400 kb uzaklıktadır. F8A homologları arasındaki intrakromozomal rekombinasyon ağır hemofiliye yol açar. FIX geni ise 34 Kb uzunluğundadır ve 8 eksondan oluşur. mRNA'sı ise 2Kb'dir.

Her iki gende nokta mutasyonları ya DGGE, SSCP gibi hızlı gen trama yöntemleri ile veya doğrudan PCR ve DNA dizi analizi ile belirlenebilmektedir. Büyük genomik değişiklikler ise Southern blot veya özel PCR yöntemleri ile saptanabilmektedir.

Türkiye'de, hemofili hastalığına yol açan mutasyonlar klinik bulguların (ör.faktör düzeyleri, inhibitör oluşumu) ışığında belirli bir strateji izlenerek yaklaşık 2-3 ay içinde saptanabilmektedir.

### **Hemofili A'nın moleküler patolojisi**

#### *Genomik değişiklikler*

Ağır hastaların %40'ında FVIII intron-22 inversiyon mutasyonu, %2-5'inde ise intron-1 inversiyon mutasyonu görülür. Inversiyonlar neredeyse tamamen erkek gametlerde meydana geldiği için hasta annelerinin hepsi taşıyıcı durumdadır. İnhibitör oluşumu önemli ölçüde yüksektir.

#### *Delesyon ve insersiyonlar*

En az 92 büyük delesyon rapor edilmiştir. Bunlardan hiç biri birbirinin tekrarı değildir, dolayısıyla FVIII geninin herhangi bir bölgesinin delesyon ve insersiyonlara hassas olmadığı görülmektedir. Üç orta şiddette hemofilisi olan hastada ekzon 22 veya ezon 23-24 delesyonu görülmüştür. Bu

hastaların fenotipi delesyona uğrayan ezonların etrafında kırılmanın normal (in-frame) olması ve kısmi işlevi olan FVIII salgılanması ile açıklanmaktadır. FVIII delesyonu olan hastaların yaklaşık %38'inde inhibitör oluşumuna rastlanmaktadır. En az 64 farklı küçük delesyon rapor edilmiştir. Bunların çoğu kodon kaymasına sebep olduğu için translasyonun erken sonlanmasına neden olmaktadır. Delesyon "hot spot" 9A tekrarı olan bölgede (kodon 1191-1194) görülmektedir.

28 ağır hemofili hastasında 1-13 bp'lik insersiyonlara rastlanmıştır. Bu hastalarda bir tanesi dışında inhibitör oluşumuna rastlanmamıştır. İki ailede LINE-1 elementinin insersiyonunun ağır hemofiliye yol açtığı saptanmıştır.

#### *Nokta Mutasyonları*

Hemofili mutasyon veritabanında 821 hastada en az 553 nükleotid değişimi rapor edilmiştir. Bunlardan 44 tanesi kırılma bölgesi, 75 anlamsız ve 434 yanlış anlamlı mutasyonlardır. Anlamsız mutasyon taşıyan hastaların ikisi hariç (ezon skipping) hepsinde ağır fenotip görülmektedir. Yaklaşık %45'inde inhibitör oluşumu vardır. Kırılma bölgesinde mutasyon taşıyan hastaların hiç birinde inhibitör oluşumuna rastlanmazken, bu oran yanlış anlamlı mutasyon taşıyan hastalarda %2 dir.

Yanlış anlamlı mutasyon taşıyan hastaların yaklaşık yarısında hafif ve orta şiddette hemofili görülür çünkü büyük olasılıkla bu hastalarda FVIII proteini normal miktarda bulunur ancak değişik işlevsel bozuklukları içerir. Bazı durumlarda CRM+ veya CRMred hemofili fenotipinin yapı-işlev ilişkisi bilinmektedir. Örneğin Arg 372/1689 His/Cys değişimleri trombin aktivasyonu önler ve hafif-ağır hemofiliye yol açabilir. Tyr 1680 Phe fenotipinde düşük FVIII miktarı tirozin sülfatlanması olmadığından vWF bağlanması bozulması ve FVIII stabilitesinin düşmesi ile açıklanır.

Nokta mutasyonlarının %45'i, 69 CpG dinükleotidinin olduğu yerde oluşan C>T transisyonlarıdır. Başka birçok gende olduğu gibi FVIII geninde de CG dinükleotidleri mutasyon "hot spot"larını oluşturur. Aynı mutasyon birbirinden bağımsız olarak farklı hastalarda tekrarlanabilir.

Hemofili A mutasyonlarının orijinleri mutasyon tipine bağlı olarak değişmektedir. Nokta mutasyonlar erkek gametlerde 5-10 kat fazla görülmesine rağmen

men delesyonlar dışı gametlerde 5 kat fazla görülür. Ortalama erkek/dışı mutasyon oranı 3.6 dır.

Türk hastalarında hemofili A mutasyon profili veritabanı ile karşılaştırıldığında nokta mutasyonlarının daha yüksek, büyük delesyonların ise daha düşük olduğu görülmektedir.

Hemofili A'nın moleküler patolojisi çalışılmadan önce kalıtsal FVIII eksikliğinin otozomal çekinik kalıtım gösteren ağır von Willebrand hastalığı, von Willebrand Tip 2N (Normandy) veya kombine FV ve FVIII eksikliğinden ayırıl edilmiş olması önemlidir.

### Hemofili B'nin Moleküler Patolojisi

Nokta mutasyonları, delesyon ve insersiyonlar başlıca mutasyon tipleridir. Mutasyonlara poly(A) eklenme bölgesi dışında genin bütün yapısal elementlerinde rastlanmaktadır. Ancak, Ca bağlama ve katalitik bölgede daha sık, prepeptid ve aktivasyon peptidinde daha az görülür. Hastaların yaklaşık %50 sinde FIX antijeni bulunmaz (CRM-). CRM- hemofili B'ye yol açan mutasyonlar arasında büyük delesyonlar, kodon kaymaları ve anlamsız mutasyonlar bulunmaktadır. CpG dinükleotidleri mutasyon "hot spot"larıdır. Mutasyonlar genellikle aileye özgüdür ancak bir kısmında "founder effect" görülür.

Hemofili B veritabanında 2511 hasta girişi arasında 896 farklı mutasyon görülmektedir. Bunların %71'i nokta mutasyonları, %20'si büyük delesyonlar ve %9'u küçük delesyon/insersiyonlardır. Türk hastalarında nokta mutasyonları %91, büyük delesyonlar %4.5, küçük delesyonlar ise %4.5 oranında görülmektedir.

### Doğum Öncesi Tanı ve Taşıyıcıların Belirlenmesi

Taşıyıcı belirlenmesi ve doğum öncesi tanı amaçlı hemofili A genetik analizi, genellikle, FVIII geninde veya yakınında bulunan DNA dizi polimorfizmlerinin kullanılmasına dayanmaktadır. Son yıllarda ise ailelerin erken bilinçlendirilmesine ve moleküler genetik yöntemlerindeki gelişmelere bağlı olarak hemofili taşıyıcılarının belirlenmesi ve doğum öncesi tanı doğrudan hastalığa yol açan mutasyonun saptanmasına dayandırılmaktadır. Hastalığa yol açan mutasyonun saptanabildiği durumda taşıyıcı ve doğum öncesi tanı kesinlik kazanır. Inversiyon mutasyonlarının analizi ağır hemofilide %40 kesin tanı olanağı sağlamaktadır.

Mutasyon bilinmiyorsa FVIII geninin intronik bölgelerinde bulunan 11, ezonlarda bulunan 14 dizi polimorfizmi tanı için kullanılabilir. Bir markörün kullanılabilmesi için aile ağacında heterozigot bir hasta annesinin bulunması şarttır. Irklar arasında polimorfik allel frekanslarında fark olmadığından bütün aileler için optimal olan markör yoktur. Bazı markörlerin kullanımı ise "linkage disequilibrium" ile kısıtlanmaktadır. Eğer geniçi markörler informatif değilse gendışı RFLP ler de kullanılabilir. FVIII geni için sıklıkla kullanılan St14 (DXS52) lokusunda kadınların hemen hemen informatiftir. Gendışı markörlerin kullanımında polimorfik markör ile gendeki mutasyon arasında rekombinasyon olasılığı (yaklaşık %5) gendışı markör kullanımını önemli ölçüde kısıtlar.

Sonuç olarak DNA bağlantı analizi kullanılarak test edilen kadınların %95'ine tanı verilebilmektedir. DNA eldesi için fetal örnekler 10-14 haftada koryonik villus biyopsisi veya 10-20 haftalar arasında amniyosentez ile yapılmaktadır.

Hastanın tek olduğu ailelerde DNA polimorfizmleri ile taşıyıcıların saptanması çok kesin değildir. Bu durumda DNA bağlantı analizi ile annenin taşıyıcı olmadığı (exclusion analysis) söylenebilir ama taşıyıcı olduğu veya erkek bir fetüsün hasta olacağı söylenemez. FVIII mutasyonları erkek gametogenez de 3.6 katı daha sıklıkla görüldüğü için, hemofili A annelerinin %85'i taşıyıcıdır. Böyle bir belirsizlik olduğu için bu ailelere genetik danışmanlık verilirken plazma FVIII düzeyine bakılır. Genellikle heterozigot taşıyıcıların FVIII düzeyleri homozigot normal bireyler ve hemofilik bireylerin FVIII düzeyleri arasında bir değerdir. Ancak, FVIII aktivitesi birçok etkene bağlı olarak değişkendir. Örneğin, X-inaktivasyonu, bazı fizyolojik şartlarda geçici veya uzun süreli yükselmeler. Genetik analizler, normal erkeklerde bile FVIII düzeyinin farklı olmasına yol açan normal FVIII alellerinin veya gene yakın başka bölgelerin olduğunu düşündürmektedir. FVIII düzeyini etkileyen gene bağlı olmayan örneğin ABO kan grubu bölgesi gibi bölgeler de vardır.

Hemofili B'de taşıyıcıların belirlenmesi ve doğum öncesi tanı hemofili A'ya benzerlik gösterir. Polimorfik markerlar arasındaki kuvvetli bağ, bazı markörlerin kullanımını kısıtlar. Bu markörlerin kullanımı etnik gruplar arasında da önemli farklar oluşturur. FIX mutasyonları hemen hemen her hastada saptanabilmektedir. Doğum öncesi tanı da bu yöntem uygulanabilir ve böylece kesin tanı sağlanmış olur.

### Hemofilide Gen Tedavisi

Gen transfer yöntemlerindeki gelişmeler, genin kendi kontrol kaseti ile transferinin giderek önem kazandığını göstermektedir. Yeni moleküler yaklaşımlar ile RNA moleküllerinin kullanımı ile farede FVIII geninin mutasyon taşıyan bölgesi tamir edilebilmektedir (spliceosome mediated RNA transplicing, SmART) (3).

### Sonuç

Hemofili moleküler genetiği alanında yapılan çalışmalar hemofili B'lerin hemen hepsinde, hemofili A'ların da büyük çoğunluğunda sırasıyla FIX ve FVIII genlerinde mutasyonların saptanabildiğini göstermiştir. Bir hemofili hastasının mutasyonun bilinmesi i) ailesindeki taşıyıcıların kesin olarak belirlenebilmesi ve kesin doğum öncesi tanı yapılabilmesi için ii) inhibitör oluşumu hakkında bilgi verebildiği için tedavi stratejisinin saptanma-

sı açısından iii) ilerde geliştirilecek gen tedavisi yöntemlerin uygulanabilmesi için büyük önem taşımaktadır.

Türk hastalarında mutasyon profillerinin hemofili A ve hemofili B veritabanlarına göre bazı farklılıklar taşınmasının ne derece önemli olduğu ve populasyonların genotipik farklılığından mı kaynaklandığı daha çok sayıda hastada moleküler patolojinin çalışılması ile mümkündür.

### Kaynaklar

1. J. E. Sadler, E.W Davie; Hemophilia A, Hemophilia B, and von Willebrand Disease, pp680-718 in Molecular Basis of Blood Diseases Ed.
2. N.S. Key; Inhibitors in congenital coagulation disorders, *British Journal of Haematology* (2004), **127**: 379-391.
3. S.W. Pipe, J-M. Saint-Remy, C.E. Walsh; New high-technology products for the treatment of haemophilia, *Hemophilia* (2004), **10**:55-63.