

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 575.224.2; 575.113.2; 577.21

ȘIROCOVA NATALIA

STUDIAREA POLIMORFISMULUI GENELOR *F8* ȘI *F9* LA
PACIENȚII CU HEMOFILIE A ȘI B ÎN REPUBLICA
MOLDOVA

03.00.15 - GENETICĂ

Autoreferatul tezei de doctor în biologie

CHIȘINĂU, 2010

Teza a fost elaborată în laboratorul *Genetică moleculară* al Institutului de Genetică și Fiziologie a Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei și laboratorul *Genetică moleculară umană* al Centrului Național de Sănătate a Reproduserii și Genetică Medicală.

Conducător științific:

Barbacar Nicolae, dr. hab. biol., prof. cercet.

Consultant științific:

Țurea Valentin, dr. hab. med., conf. univ.

Referenți oficiali:

Duca Maria, dr. hab. biol., prof. univ., m. cor. al AȘM, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei;

Cemortan Igor, dr. biol., conf. univ., Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „N. Testemițanu”.

Componența consiliului științific specializat:

Lupașcu Galina, președinte, dr. hab. biol., conf. cercet.;

Cotenco Eugenia, secretar științific, dr. biol., conf. cercet.;

Bucătaru Nicolae, dr. hab. biol., prof. univ.;

Curocichin Ghenadie, dr. hab. med., conf. univ.;

Tumanova Lidia, dr. chim., conf. cercet.

Susținerea va avea loc la 20 mai 2010, ora 10⁰⁰, în ședința Consiliului științific specializat DH 10.03.00.15-11 din cadrul Institutului de Genetică și Fiziologie a Plantelor al Academiei de Științe a Moldovei, MD 2002, str. Pădurii 20, Chișinău, tel.: (+373 22) 770447, fax: (+373 22) 556180.

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la biblioteca Institutului de Genetică și Fiziologie a Plantelor și pe pagina web a CNAA (www.cnaa.md).

Autoreferatul a fost expediat la 15 aprilie 2010.

Secretar științific al consiliului științific specializat:

Cotenco Eugenia, dr. biol., conf. cercet.

Conducător științific:

Barbacar Nicolae, dr. hab. biol., prof. cercet.

Consultant științific:

Țurea Valentin, dr. hab. med., conf. univ.

Autor

Șirocova Natalia

(© Șirocova Natalia, 2010)

REPERE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea temei. Hemofiliile A și B (MIM#306700, MIM#306900) reprezintă cele mai frecvente și grave patologii ale sistemului de coagulare a sîngelui, cauzate de mutațiile în genele factorilor VIII (*F8*) și, respectiv, IX (*F9*). În toate populațiile cercetate incidența hemofiliei A constituie aproximativ 1:5000-10000 băieți, iar a hemofiliei B – 1:30000. Recent, datorită eficientizării tratamentului contemporan, s-a atestat creșterea numărului pacienților și purtătoarelor de hemofilie, ceea ce conduce la acumularea genelor patologice în populație. Cercetarea activității de coagulare a factorului VIII sau IX, din păcate, nu poate fi utilizată pentru determinarea statutului de purtător. Astfel, testarea molecular-genetică este actualmente o etapă importantă în depistarea genelor mutante la purtătoarele potențiale, iar în cazul confirmării statutului, este necesară în diagnosticul prenatal.

Descrierea situației în domeniul de cercetare și identificarea problemelor de cercetare. În genele ce codifică factorii VIII și IX au fost depistate mutații punctiforme, inserții, deleții și inversii. Mai mult de 1200 de mutații ale genei corespunzătoare factorului VIII au fost identificate și descrise în baza de date a hemofiliei A HAMSTeRS (The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site), ca fiind cauzele bolii [1]. O mutație majoră a genei *F8*, atestată la aproximativ 50% pacienți cu hemofilie A severă, este inversia intronului 22. La 3% de persoane afectate s-a depistat inversia intronului 1. La persoanele bolnave au mai fost identificate mutații *nonsense*, *missense*, decalări ale fazei de lectură (*frameshift*) sau substituții genice mari, deleții și inserții majore. Mutațiile *missense* în exonii ce codifică 3 domenii A și 2 domenii C predomină la pacienții cu forma ușoară a hemofiliei [2].

Peste 1000 mutații ale genei ce codifică factorul IX au fost înregistrate în baza de date a hemofiliei B [3]. Delețiile majore ale unei regiuni a genei sau a întregii gene *F9*, substituțiile genice mari, substituțiile situsurilor de *splicing*, mutațiile *nonsense*, *missense* și decalări ale fazei de lectură asociate cu hemofilie B influențează severitatea bolii într-o măsură mult mai mare, comparativ cu forma severă a hemofiliei A. Formele moderate și ușoare ale hemofiliei B sunt, în majoritatea cazurilor, asociate cu mutațiile *missense* [4]. Așadar, gradul de severitate a manifestărilor clinice ale patologiei este determinat de tipul mutației.

Din cauza incidenței înalte, complicațiilor în timpul tratamentului și invalidității grave, provocate de hemofilie, elaborarea unui sistem eficient de diagnostic molecular-genetic este necesară în scopul profilaxiei acestei patologii în familiile cu risc înalt, ceea ce prezintă o motivare logică a efectuării cercetărilor descrise.

Scopul tezei: analiza molecular-genetică a genelor *F8* și *F9* la pacienții și membrii familiilor cu hemofilie A și B.

Obiectivele tezei:

1. Crearea băncii de ADN al pacienților afectați de hemofilie și al membrilor familiilor acestora.
2. Efectuarea investigației molecular-genetice a secvenței codificatoare și a regiunilor conexiunii exon-intronice ale genelor *F8* și *F9* la persoanele cu hemofilie A și B.
3. Cercetarea polimorfismelor STR (*shot tandem repeats*) și RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) ale genelor *F8* și *F9* la lotul martor și la familiile cu hemofilie A și B; estimarea nivelului asocierilor alelice ale regiunilor intragenice polimorfe.
4. Elaborarea unui algoritm eficient de diagnostic molecular al hemofiliei A și B pentru Republica Moldova.

Metodologia cercetării științifice include utilizarea variatelor metode bazate pe PCR, analizele heteroduplexurilor și restricțională, determinarea structurii primare a ADN prin metoda Sanger. Estimarea veridicității datelor statistice a fost realizată aplicând criteriul χ^2 .

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată s-au efectuat investigații molecular-genetice ale întregii secvențe codificatoare și ale regiunilor conexiunii exon-intronice ale genelor *F8* și *F9* la pacienții cu hemofilie A și B din Republica Moldova. S-au obținut date despre spectrul și frecvența mutațiilor. S-au identificat mutații noi, nedescrise la moment: în gena *F8* – p.Gln1303X; p.Glu1430X; p.Gln1906X; p.Pro130LeufsX11; p.Trp960GlyfsX25; p.Ser1791LeufsX60; c.602-5T>C; c.6430-2A>G; p.Gly244Arg; p.Gly455Trp; p.Asp459Tyr; p.Asn612Asp; p.Asn1805Ile; p.Tyr1837Cys; p.Ala2061Thr; în gena *F9* – c.118-2A>C, c.550-1G>A.

S-au obținut date noi privind repartizarea alelelor situsurilor polimorfe ale genelor *F8* și *F9* la grupul de control și s-a determinat nivelul asocierilor alelice ale regiunilor intragenice.

Semnificația teoretică. Rezultatele obținute completează cunoștințele existente despre bazele moleculare ale hemofiliei și consecințele funcționale ale mutațiilor în genele ce codifică factorii de coagulare.

Valoarea aplicativă. A fost creată banca de ADN al pacienților și membrilor familiilor cu hemofiliile A și B. Au fost identificate mutațiile genelor *F8* și *F9* în Republica Moldova.

A fost elaborat algoritmul de diagnostic molecular, care permite relevarea pînă la 85,7% mutații în gena *F8* și pînă la 100% – în gena *F9* la bolnavii afectați de hemofilie. Algoritmul propus poate fi utilizat atît pentru determinarea statutului de purtător la femeile cu risc înalt, cît și în cadrul diagnosticului prenatal, ceea ce prezintă o etapă importantă a consultului medico-genetic eficient și a profilaxiei acestei patologii ereditare.

Pentru 39 femei din familiile cercetate s-a constatat statutul de purtător al hemofiliei, iar 7 familii au beneficiat de diagnostic prenatal.

Începînd cu utilizarea în practica de tratament al hemofiliei a preparatelor factorilor VIII și IX, datele despre genotipul pacienților vor permite estimarea riscului asociat de dezvoltare a inhibitorilor aloimuni și elaborarea programelor de terapie imunotolerantă pentru o tratare eficientă.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere:

1. S-au depistat 15 mutații noi ale genei *F8* și 2 mutații noi ale genei *F9*. S-a efectuat interpretarea a 7 mutații *missense* noi.
2. Pentru diagnosticul hemofiliei A s-au identificat 3 regiuni intragenice cu nivel informațional înalt: HindIII/intron 19, AluI/intron 1 și CA-repetiții în intronul 13.
3. Pentru diagnosticul hemofiliei B au fost depistate situsurile cu nivel informațional înalt DdeI, MseI și HhaI.
4. S-au elaborat algoritmi de diagnostic care permit relevarea a circa 85,7% mutații în gena *F8* și pînă la 100% mutații în gena *F9* la bolnavii afectați de hemofilie A sau B.

Implementarea rezultatelor științifice. Datele științifice obținute sunt implementate în practica consultațiilor genetice privind hemofilia din cadrul Centrului Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală.

Aprobarea rezultatelor. Rezultatele tezei au fost discutate și aprobate în cadrul: ședinței Consiliului științific specializat al IGFP (2009), Congresului Asociației Europene de Hematologie (Stocholm, 2005), Conferinței internaționale „Генетика в России и мире” (Moscova, 2006), Conferinței științifice internaționale „Învățămîntul superior și cercetarea” (Chișinău, 2006), Conferinței Europene de Genetică Umană (Amsterdam, 2006), Congresului Federației Mondiale de Hemofilie (Istanbul, 2008), ședinței Societății Pediatriilor (Chișinău, 2008), Congresului al V-la al Pediatriilor și Neonatologilor (Chișinău, 2009).

Cercetările au fost efectuate cu suportul financiar al fundațiilor MRDA și CRDF, grantul MTFP-04-10.

Publicațiile la tema tezei. Rezultatele științifice obținute sunt publicate în 11 lucrări, inclusiv 5 articole în reviste recenzate internaționale și naționale, 6 materiale ale comunicărilor științifice în cadrul conferințelor de nivel național și internațional.

Volumul și structura tezei. Rezultatele cercetărilor efectuate sunt expuse pe 96 pagini de text de bază. Teza include introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie din 159 titluri, 5 anexe și este ilustrată cu 12 tabele și 29 figuri.

Cuvintele-cheie: hemofilie, genele *F8* și *F9*, factorii VIII și IX, genotip, mutație, polimorfism, diagnostic molecular.

CONȚINUTUL TEZEI

1. BAZELE MOLECULARE ALE HEMOFILIEI

Factorii VIII și IX se implică în procesul de coagulare a sîngelui și sunt activați în timpul dereglărilor hemostatice prin mecanisme interne sau externe. Hemofilia este cauzată de mutații în genele ce codifică factorii de coagulare.

Gena *F8* este localizată în banda distală a brațului lung al cromozomului X, Xq28, conține 26 exoni și are o lungime de ~ 186 mii perechi de baze azotate (p.b.) [5]. Structura primară a genei *F9* a fost descrisă de Yoshitake și colab. în anul 1985 [6]. Gena *F9* este mult mai scurtă ca gena *F8*, avînd aproximativ 34 mii perechi de baze azotate, și include 8 exoni. Gena *F9* este, de asemenea, localizată în partea terminală a brațului lung al cromozomului X, în poziția Xq27. Gena ce codifică factorul VIII este situată la o distanță semnificativă de cea a factorului IX și *linkage*-ul genetic între ele nu s-a atestat.

Pentru diagnosticul molecular al hemofiliei se utilizează investigarea directă a ADN, care include identificarea mutațiilor patologice în genele *F8* sau *F9*. Dacă anumite circumstanțe nu permit identificarea directă a mutațiilor, se utilizează investigațiile indirecte ale genelor sau analiza *linkage*-ului în scopul depistării alelei care determină dezvoltarea patologiei.

2. MATERIALE ȘI METODE

2.1 Materialele cercetării

Pentru investigațiile molecular-genetice s-au utilizat probele de ADN genomic ale 80 pacienți din 61 familii cu hemofilie A și 9 pacienți din 5 familii cu hemofilie B, cît și ADN al 109 membri ai familiilor acestora. Pentru comparație s-au selectat 65 eşantioane de ADN genomic al persoanelor sănătoase, care au prezentat lotul martor. În cadrul diagnosticului prenatal au fost cercetate 7 probe de ADN fetal, prelevate prin biopsia vilozităților coriale sau amniocenteză.

Secvențierea ADN a fost realizată în laboratorul condus de dr. A.R. Thompson. Vizualizarea situsurilor mutațiilor *missense* a fost efectuată de dr. K. Pratt, Puget Sound Blood Center, Seattle, S.U.A.

2.2 Metodele cercetării

ADN genomic a fost izolat cu ajutorul proteinazei K prin metoda extragerii fenol-cloroformice. Prezența inversiilor intronului 22 s-a determinat în rezultatul amplificării fragmentelor lungi, după cum este descris în [7]. Inversia intronului 1 s-a analizat prin PCR [8].

Regiunile codificatoare ale genelor *F8* și *F9*, inclusiv și succesiunile flancante, au fost amplificate cu ajutorul primerilor corespunzători. Analiza heteroduplexurilor s-a realizat în 5 μ l de produse de amplificare corespunzătoare exonilor pacientului și martorului, care au fost incubate, utilizând următorul program de denaturare-aliniere: 94°C - 3 min., 80°C - 2 min., 70°C - 2 min., 65°C - 15 min., 50°C - 5 min., 40°C - 2 min. și 37°C - 15 min., cu vizualizarea ulterioară în gelul 1xMDE™. Probele cu un *pattern* de migrare diferit de cel al controlului au fost supuse secvențierii automate, utilizând dispozitivul Genetic Analyzer, modelul 3100 (Applied Biosystems, S.U.A.), în conformitate cu protocolul propus de producător. Mutațiile se confirmau prin secvențierea ADN-ului altui pacient din aceeași familie sau al purtătoarei, prin analiză restricțională sau prin secvențierea altui fragment amplificat al ADN pacientului investigat.

Evaluarea modificărilor mutaționale în situsurile *splicing*-ului s-a efectuat cu ajutorul *soft*-ului «SplicePort» [9]. Estimarea influenței mutațiilor *missense* asupra structurii și funcționalității factorului VIII s-a realizat prin utilizarea programelor PolyPhen și CUPSAT.

Alelele situsurilor polimorfe intragenice au fost înregistrate în rezultatul amplificării regiunilor corespunzătoare și analizei restricționale cu separarea ulterioară a fragmentelor în gel de poliacrilamidă (cu concentrația 6–12%, în dependență de necesitate).

Analiza statistică a fost realizată aplicând criteriul χ^2 .

3. ANALIZA MOLECULARĂ A POLIMORFISMULUI GENEI *F8* LA FAMILIILE CU HEMOFILIE A ȘI LA GRUPUL DE PERSOANE SĂNĂTOASE

3.1 Analiza moleculară a mutațiilor în gena *F8* la bolnavii cu hemofilia A

În scopul identificării mutațiilor ce cauzează patologia, s-a cercetat ADN al 75 pacienți din 57 familii cu hemofilia A. Severitatea bolii a fost estimată prin cercetarea cantitativă a factorului VIII la 53 familii și în baza fenotipului clinic – la 4 familii [10]. Ținând cont de faptul că toți probanzii unei familii posedă același genotip mutațional, identificarea mutațiilor se efectua doar la o singură persoană din familie. La toți pacienții investigați s-a genotipat doar o mutație în regiunea codificatoare a genei *F8*.

3.1.1 Cercetarea inversiilor intronului 22 și ale intronului 1

Forma severă a patologiei a fost diagnosticată în 41 cazuri din cele 57 familii investigate. Inversia intronului 22 constituie rezultatul *crossingover*-ului intranemic, intercromozomial sau intercromatidic, între succesiunea int22h și 2 copii extragenice ale acesteia (Fig. 3.1).

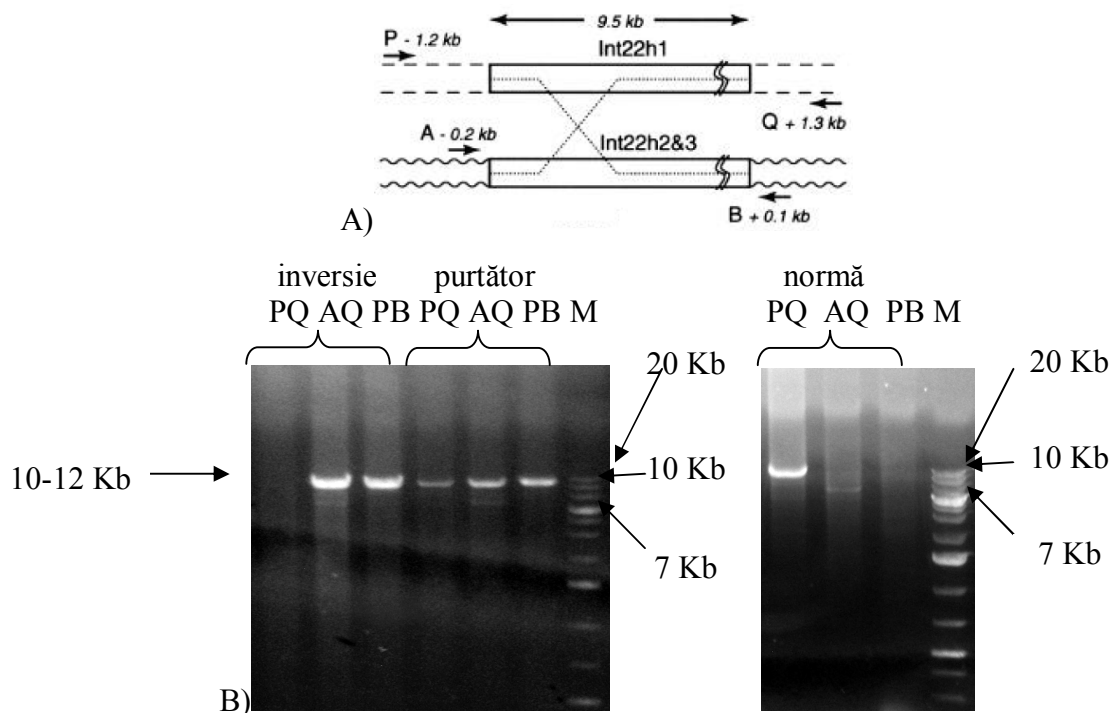


Fig. 3.1. Identificarea inversiei intronului 22 în gena *F8*.

A) Dreptunghiul de sus reprezintă succesiunea normală a int22h-1, iar cel de jos – succesiunile int22h-2 și int22h-3; prin linie întreruptă este prezentată recombinarea posibilă între regiunile vizate. P, Q, A și B – primerii utilizați în PCR [6].

B) Analiza electroforetică în gel de agaroză (1%) a fragmentelor PCR obținute în rezultatul cercetării inversiei intronului 22. M – marker al lungimii 1 Kb Plus (Fermentas Ltd).

Ca rezultat al cercetării ADN-ului a 41 pacienți cu forma severă a hemofiliei A, în 16 cazuri (39%) s-a depistat inversia intronului 22, prezentînd un nivel înalt de informativitate a mutației menționate în diagnosticul maladiei. O altă mutație majoră ce determină dezvoltarea formei severe a patologiei, inversia intronului 1, a fost relevată în 1 caz, ceea ce reprezintă 2,4%.

3.1.2 Analiza genetică a mutațiilor neinversionale

În scopul depistării mutațiilor la 24 pacienți cu forma severă a hemofiliei A și la 16 persoane cu formele moderată/ușoară, s-a utilizat analiza heteroduplexurilor.

La 30 pacienți s-a atestat modificarea *pattern*-ului de migrare a fragmentului de ADN corespunzător unui exon anumit al genei *F8*. La 1 pacient s-a depistat deleția exonilor 15 – 18 și la încă un bolnav – deleția exonului 26. La 8 pacienți (3 cu forma severă, 2 – moderată și 3 – ușoară) nu s-au identificat mutații.

În total, la 49 familii au fost relevate 29 mutații unice (Tab. 3.1 și 3.2) care, alături de 2 inversii și 2 deleții majore, mai includ 4 deleții mici, 1 inserție, 3 mutații în situsurile *splicing*-ului, 3 mutații *nonsense* și 13 *missense*. Încă o mutație a fost depistată în rezultatul analizei

heteroduplexurilor și necesită secvențiere pentru determinarea tipului acesteia. Din numărul total de mutații genotipate, 15 nu au fost identificate în alte populații cercetate [11, 12].

Tabelul 3.1. Mutațiile genei *F8* identificate la bolnavii cu hemofilie A din Republica Moldova, cu excepția mutațiilor *missense*

Familia	Exon sau intron	Modificarea nucleotidică [‡]	Mutația [§]	FVIII:C (%)	Domeniul FVIII	Originea
<i>Inversiile</i>						
01-16	intronul 22			<1		3F,10S
17	intronul 1			<1		S
<i>Delețiile parțiale ale genei F8</i>						
18	exonii 15-18	c.5220-?_c.5998+?del		<1	A3	S
19	exonul 26	c.6901-?_c.7056+?del		<1	C2	F
<i>Mutațiile nonsense</i>						
20	exonul 14	c.3963C>T*	p.Gln ¹³⁰³ X	<1	B	S
21	exonul 14	c.4345C>T*	p.Glu ¹⁴³⁰ X	<1	B	S
22	exonul 17	c.5773C>T*	p.Gln ¹⁹⁰⁶ X	<1	A3	S
<i>Decalări ale fazei de lectură</i>						
23	exonul 4	c.444delC*	p.Pro130LeufsX11	<1	A1	S
24	exonul 14	c.2935delT*	p.Trp960GlyfsX25	<1	B	S
25	exonul 14	c.3637delA	p.Ile1194PhefsX5	5	B	S
26,27	exonul 14	c.4379_4380insA	p.Asn1441LysfsX1	<1,<1	B	F, S
28	exonul 16	c.5428delT*	p.Ser1791LeufsX60	1	A3	F
<i>Mutațiile situsului acceptor al splicing-ului</i>						
29	intronul 4	c.602-2A>G		<1	A1	F
30	intronul 4	c.602-5T>C*		2	A1	F
31	intronul 22	c.6430-2A>G*		<1	C1	F

[‡] Mutațiile sunt descrise conform recomandărilor HGVS (Human Genom Variation Society), succesiunea de referință NM_000132.3. [§] Numerotarea aminoacizilor s-a efectuat în conformitate cu nomenclatura HAMSTeRS, * o mutație nouă, nedescrisă în HAMSTeRS. F – caz familial al hemofiliei, S – caz sporadic, X – codonul stop.

3.1.2.1 Mutațiile situsurilor splicing-ului

Mutațiile în situsurile acceptor al *splicing*-ului au fost depistate la 2 familii cu formă severă și 1 familie cu forma moderată a hemofiliei A.

Substituția adeninei cu guanină în poziția c.602-2A>G (-2 p.b. IVS4 A>G), în aval de exonul 5, a condus la modificarea *site*-ului *splicing*-ului (Fig. 3.2. A). Întrucât exonul 5 face parte din faza de lectură, mutația menționată poate cauza fenomenul de „omitere a exonului” (*exon skipping*), ceea ce funcțional echivalează cu deleția parțială a genei [13].

Substituția nucleotidică c.602-5T>C a fost identificată la un pacient cu caz familial al hemofiliei A (Fig. 3.2. B). Alte mutații în structura primară a regiunii codificatoare a genei *F8* nu

au fost atestate. Substituția intronică c.602-5T>C a fost analizată cu ajutorul programului *SplicePort*. Ca rezultat, s-a stabilit că tranziția investigată reduce semnificativ valoarea limită a situsului acceptor al *splicing*-ului cu sensibilitatea 88,5% de la 0,93, specific pentru succesiunea normală, pînă la 0,34.

A)

```

0182 ly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe II 0196
I 35401 ttctcacttcttttcg gg agt ctg gcc aag gaa aag aca cag acc ttg cac aaa ttt at
      ↓
II  ttctcacttcttttcg.....

```

B)

```

0182 ly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe II 0196
I 35401 ttctcacttcttttcag gg agt ctg gcc aag gaa aag aca cag acc ttg cac aaa ttt at
      ↓
II  ttctcacttcttttcag.....

```

Fig. 3.2. Substituțiile nucleotidice ce induc modificări în situsul acceptor al *splicing*-ului din intronul 4 al genei *F8*.

A) mutația c.602-2A>G, B) mutația c.602-5T>C. Rîndul I – succesiunea normală a intronului 4 – exonului 5, gena *F8* (NG_005114.1), prin *bold* s-a evidențiat succesiunea exonului 5. Rîndul II – succesiunea modificată; mutația punctiformă este marcată cu dreptunghi color.

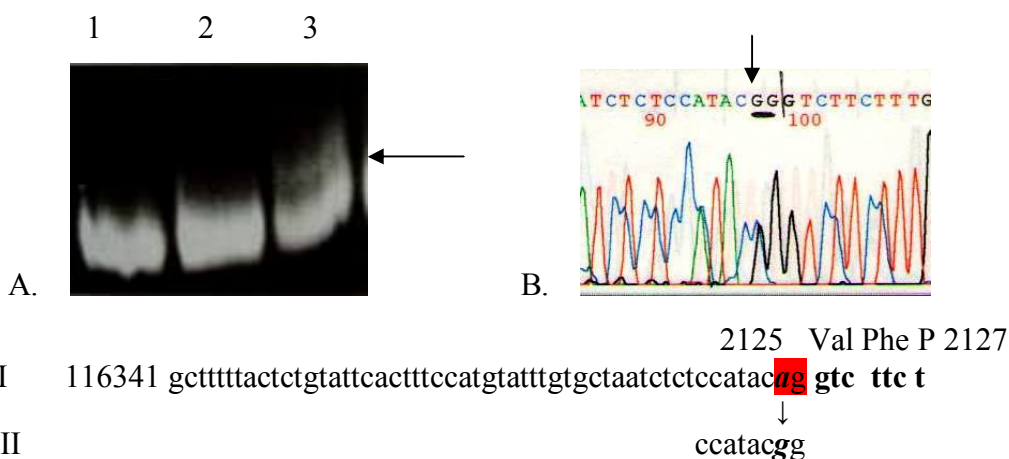


Fig. 3.3. Substituția nucleotidică în poziția c.6430-2A>G care induce modificare în situsul acceptor al *splicing*-ului.

A) Rezultatele analizei heteroduplexurilor a exonului 23 (trecur 1 – control, ADN normal, 2, 3 – ADN pacienților); modificarea *pattern*-ului de migrare se vizualizează în trecur 3. B) Rezultatele secvențierii exonului 23. C) Rîndul I – succesiunea normală a intronului 22 – exonului 23 a genei *F8*, prin *bold* s-a evidențiat succesiunea exonului; rîndul II – succesiunea modificată; mutația este marcată cu dreptunghi color.

A treia mutație a situsului acceptor al *splicing*-ului a fost, de asemenea, identificată la un pacient cu caz familial al hemofiliei A, reprezentînd substituția c.6430-2A>G (Fig. 3.3). Mutația identificată nu este descrisă în HAMSTeRS .

3.1.2.2 *Decalări ale fazei de lectură*

Mutațiile ce cauzează decalările fazei de lectură au fost identificate la 6 familii, 4 din care reprezintă deleții ale unui nucleotid și inserție repetată a unui nucleotid.

Sucesiunile bogate în adenină sunt frecvent supuse mutațiilor ce induc decalarea fazei de lectură. Una din mutațiile nucleotidice descrise anterior este deleția adeninei în poziția p.Ile1194PhefsX5 din succesiunea formată din 9 A, care a fost relevată la pacientul cu formă moderată a patologiei. Mutația vizată se asociază atât cu fenotipul sever, cât și cu cel moderat.

Inserția unui nucleotid adenozinic, p.Asn1441LysfsX1, în succesiunea din 9 A a fost identificată în două familii neînrudite, afectate de formă severă a hemofiliei A. Una din familiile menționate reprezintă un caz sporadic al patologiei.

Trei deleții noi, nedescrise la moment, p.Pro130LeufsX11, p.Trp960GlyfsX25 și p.Ser1791LeufsX60, ce cauzează decalarea fazei de lectură și apariția prematură a stop-codonului, sunt asociate cu fenotipul clinic sever.

3.1.2.3 *Mutațiile nonsense*

La 3 familii investigate au fost identificate mutații *nonsense*. Toate 3 mutații sunt noi, neînregistrate în baza de date HAMSTeRS. Mutațiile *nonsense* au fost relevate în familiile cu formă severă a patologiei, care corespunde lipsei totale a proteinei funcționale a factorului VIII.

Mutația c.3963C>T reprezintă substituția codonului glutaminic – CAG cu stop-codonul TAG în poziția 1303, rezultând în sinteza produsului proteic incomplet, ulterior eliminat. A doua mutație *missense*, c.4345C>T, a fost de asemenea identificată în exonul 14 al genei *F8*, ce codifică domeniul B. În exonul 17 a fost atestată substituția C>T în poziția c.5773, determinând apariția codonului TAG.

3.1.2.4 *Mutațiile missense*

În 17 familii rămase au fost depistate 13 mutații *missense*, localizate în domeniile A1, A2, A3 și C1 ale cofactorului activat FVIIIa. Următoarele 7 substituții aminoacidice nu au fost identificate până la moment în alte populații cercetate: G244R, G455W, D459Y, N612D, N1805I, Y1837C și A2061T (Tab.3.2). Mutațiile P1854L, A2061T și R2163H au fost detectate în câteva familii.

Mutația p.Gly244Arg este cauzată de substituția guaninei cu citozina în ultimul nucleotid al exonului 6. Glicina din poziția 244 reprezintă un aminoacid expus la suprafață și nu se implică în interacțiunile între domenii (Fig. 3.4. A). Substituția G cu C modifică succesiunea canonică a situsului donor al *splicing*-ului, reprezentând cauza dezvoltării formei severe a hemofiliei A.

Mutația p.Thr275Ile a fost identificată la pacientul cu activitatea factorului VIII de 3,8%. Treonina în poziția 275 formează, împreună cu resturile 271-287, o buclă neregulată în structura

domeniului A1, care interacționează cu bucla domeniului A2, constituită din resturile 517-524. Substituția treoninei cu izoleucina poate afecta interacțiunea între domeniile menționate. Ținând cont de faptul că FVIIIa activat se inactivează prin disocierea domeniului A2 [14], mutația p.Thr275Ile cauzează reducerea perioadei de funcționare a proteinei.

Substituția aminoacidică Arg372Cys a fost depistată la pacientul, nivelul factorului VIII al căruia a constituit 3%. Hidroliza catenei grele a factorului VIII în poziția arginină 372 – serină 373 este necesară pentru expunerea situsului ce interacționează cu factorul IXa.

Tabelul 3.2. Mutațiile *missense* ale genei *F8* identificate la pacienții cu hemofilie A din Republica Moldova

Familia	Exon sau intron	Substituția nucleotidică [‡]	Mutația [§]	Forma fenotipică	FVIII: C (%)	Domeniul FVIII	Originea
32	exonul 6	c.787G>C*	p.Gly244Arg	severă	<1	A1	S
33	exonul 7	c.881C>T	p.Thr275Ile	moderată	4	A1	S
34	exonul 8	c.1171C>T	p.Arg372Cys	moderată	3	A1	F
35	exonul 9	c.1331A>G	p.Lys425Arg	severă		A2	S
36	exonul 9	c.1420G>T*	p.Gly455Trp	severă	<1	A2	S
37	exonul 9	c.1432G>T*	p.Asp459Tyr	severă	<1	A2	S
38	exonul 12	c.1891A>G*	p.Asn612Asp	severă	<1	A2	S
39	exonul 16	c.5471A>T*	p.Asn1805Ile	severă	1	A3	F
40	exonul 16	c.5567A>G*	p.Tyr1837Cys	severă	<1	A3	F
41-43	exonul 17	c.5618C>T	p.Pro1854Leu	moderată	2-4	A3	2F, 1S
44,45	exonul 21	c.6238G>A*	p.Ala2061Thr	moderată	5, 5	C1	F,S
46	exonul 22	c.6319G>A	p.Gly2088Ser	moderată	2	C1	S
47,48	exonul 23	c.6545G>A	p.Arg2163His	severă	<1,1	C1	2S
49 [‡]	exonul 11			moderată	1,5	A2	S

[‡] Mutațiile sunt descrise conform recomandărilor HGVS, succesiunea de referință - NM_000132.3. [§] Numerotarea aminoacizilor s-a efectuat în conformitate cu nomenclatura HAMSTeRS, * o mutație nouă, nedescrisă în HAMSTeRS; [‡] – mutația depistată, dar, la moment, necaracterizată. F – caz familial al hemofiliei, S – caz sporadic.

Grupările aminice ale lizinei din poziția 425 a factorului VIII formează legături cu gruparea carboxilică a acidului glutaminic din poziția 581. Substituția lizinei cu arginina masivă menține sarcina pozitivă, dar modifică structura conformațională (Fig. 3.4.B). Mutația descrisă a fost relevată la un pacient afectat de forma severă a hemofiliei.

Mutația *missense* p.Gly455Trp a fost depistată la un pacient cu formă severă a hemofiliei A. Glicina 455 este un aminoacid în β -pliuri, care include resturile 453-456. Substituția glicinei cu triptofanul va cauza, probabil, ruperea structurii domeniului A2 sau va influența conformația buclei constituite din resturile aminoacidice 558-565, mutațiile căreia induc modificări în interacțiunea domeniului A2 cu factorul IXa activat, ceea ce, în final, reduce activitatea catalitică a complexului X-azic.

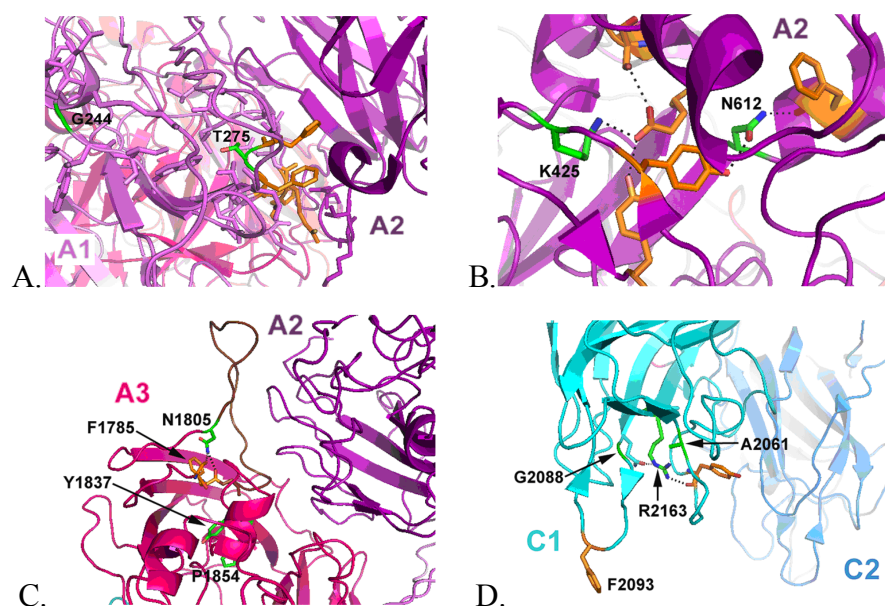


Fig. 3.4. Structura cristalină a factorului VIII în situsurile mutațiilor *missense* [14]. Se prezintă pozițiile resturilor aminoacidice și interacțiunile între domenii; liniile întrerupte reprezintă legăturile de hidrogen.

Domeniul A1 determină orientarea corectă a domeniului A2 în relație cu alte domenii ale factorului VIIIa activat, facilitând astfel interacțiunea cu situsul activ al factorului IXa. Substituția nouă a acidului asparaginic 459 cu o tirozină masivă, probabil, modifică interacțiunea cu triptofanul 382, care este parte componentă a fragmentului 373-385, ce interacționează cu dimerul A1/A3-C1-C2 [15]. Ca rezultat, mutația identificată determină modificarea activității catalitice a complexului X-azic, ceea ce explică dezvoltarea fenotipului clinic sever la pacienții cu mutația menționată.

Ultima mutație identificată în domeniul A2 reprezintă substituția p.Asn612Asp. Asparagina 612 formează legătură hidrogenică cu tirozina 423 (Fig. 3.4., B). Substituția asparaginei neutre cu acidul asparaginic modifică sarcina situsului, inducând modificări conformaționale ale regiunilor proteice vecine.

În domeniul A3 au fost identificate 2 mutații *missense* noi – p.Asn1805Ile și p.Tyr1837Cys și o mutație deja cunoscută – p.Pro1854Leu (Fig. 3.4., C). Asparagina 1805 interacționează, prin legătura de hidrogen, cu serina 1784, condiționând formarea unei bucle ce participă în interacțiunea domeniilor A2 și A3. Substituția asparaginei poate modifica interacțiunea între domeniile A menționate, destabilizând structura conformațională a proteinei. Mutația a fost depistată la un pacient cu formă severă a patologiei. Tirozina din poziția 1837 face parte din structura domeniului A3, substituția căreia cu cisteină destabilizează și modifică structura resturilor aminoacidice vecine, care determină funcția catalitică a factorului VIII.

Mutația p.Pro1854Leu a fost atestată la 3 familii neînrudite afectate de hemofilie A. Pacienții cu mutația menționată au prezentat variația nivelului factorului între 2-5%. În 2 cazuri patologia a avut caracter familial. Analiza arborelui genealogic pînă la 3 generații nu a relevat înrudirea acestor 2 familii. Cercetarea regiunilor intragenice polimorfe ale pacienților menționați a evidențiat însă haplotipuri similare – HindIII (+)/AluI(-)/I7Pg/a(-). Aceste rezultate, dar și faptul că ambele familii locuiau în aceeași regiune a Republicii Moldova, sugerează prezența *efectului fondatorului* în apariția mutației respective. În al 3-lea caz, hemofilia era de origine sporadică și haplotipul pacientului era diferit de celelalte haplotipuri investigate.

O mutație nouă, p.Ala2061Thr, a fost identificată la 2 familii neînrudite afectate de forma moderată a patologiei (FVIII:C 4-5%). Alanina 2061 este parte componentă a domeniului C1 (Fig. 3.4. D), substituția căreia cu treonină modifică hidrofobia și destabilizează catena. Pacienții cercetați au prezentat un haplotip similar HindIII (-)/AluI(+)/I7Pg/a(+).

Mutația p.Gly2088Ser, înregistrată în HAMSTeRS, a fost identificată la un pacient cu formă moderată a hemofiliei A (similar cazului descris în baza de date). Glicina 2088 și fenilalanina 2096, împreună cu resturile de aminoacizi situate între pozițiile menționate, formează o buclă la suprafața domeniului C1. Compararea succesiunii de aminoacizi a buclei cu structura *agrafei* situsului membrano-asociator din domeniul omolog C2 al factorului VIII conduce la ideea că regiunea menționată poate fi implicată în asocierea cu lipidele sau trombocitele. Arginina 2163, de asemenea, participă în menținerea structurii buclei (Fig. 3.4., D). Avînd în vedere că, în comparație cu domeniul C2, proteina recombinată constituită din domeniile C1C2 ale factorului VIII posedă o afinitate sporită față de trombocitele activate [16], regiunea menționată este responsabilă de interacțiunea factorului VIIIa activat cu membranele.

Substituția p.Arg2163His a fost depistată la 2 familii neînrudite, cu cazuri sporadice ale formei severe ale hemofiliei A. Dar și în această situație, similar mutațiilor p.Pro1854Leu și p.Ala2061Thr, la pacienții investigați s-a relevat același haplotip – HindIII (-)/AluI(-)/I7Pg/a(+), ceea ce presupune prezența *efectului fondatorului*.

Mutațiile identificate la pacienții afectați de hemofilie A au fost caracterizate în baza cunoștințelor contemporane despre structura genei *F8* și a factorului VIII. Analiza noilor mutații prezintă date suplimentare despre bazele moleculare ale hemofiliei A și explică consecințele acestora în procesul expresiei genei, precum și în cadrul interacțiunilor funcționale ale factorului VIII.

3.1.3 Frecvența mutațiilor asociate cu hemofilie A și repartizarea lor în gena F8

Analiza mutațiilor la pacienții cu hemofilie A din Republica Moldova (Fig.3.5) a relevat repartizarea acestora similar distribuției descrise anterior pentru populațiile Germaniei, Italiei, Argentinei și Indiei [17-20].

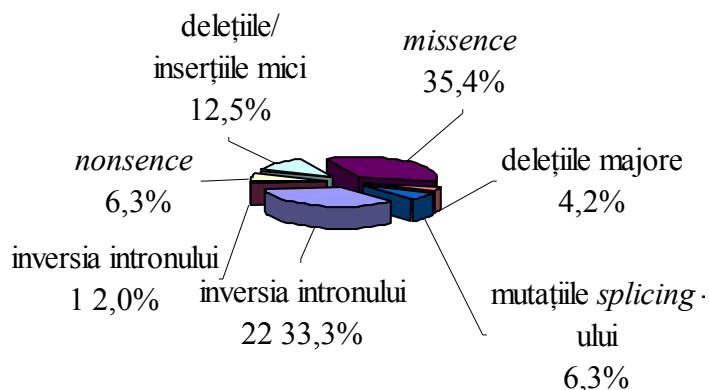


Fig.3.5. Profilul mutațional al pacienților cu hemofilie A în Republica Moldova.

Mutațiile au fost identificate la 49 (86%) familii din cele 57 investigate, în 32% cazuri constituind mutații noi. Tipul mutației a corespuns defectului molecular [21]. La 8 familii, pentru care nu s-a reușit genotiparea mutațiilor, defectul genetic poate fi localizat în intronii care nu se analizează în cadrul *screening*-ului mutațional obișnuit.

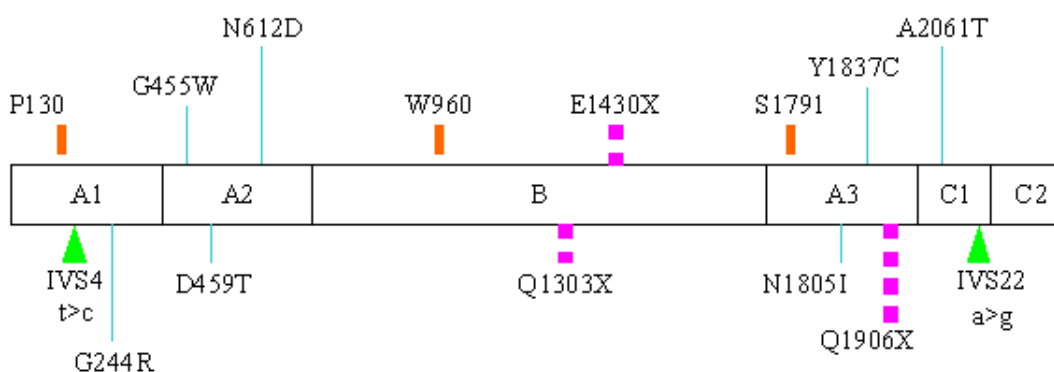


Fig. 3.6. Mutațiile noi ale genei F8.

Liniile fine de turcoază prezintă mutațiile *missense*, linia roză întreruptă – *nonsense*, linia oranj groasă– mutațiile cadrului de lectură, triunghiurile verzi – defectele *splicing*-ului.

Mutațiile punctiforme au fost depistate în 10 exoni și 3 introni ale genei F8. Localizarea defectelor noi este prezentată în figura 3.6. Rezultatele obținute demonstrează nivelul înalt al heterogenității mutațiilor din gena ce codifică factorul VIII.

3.2 Analiza moleculară a regiunilor polimorfe din structura genei *F8* la grupul de persoane sănătoase din Republica Moldova

La 14% de familii investigate nu s-au identificat mutații în regiunea codificatoare a genei *F8*. În calitate de alternativă s-a procedat la cercetarea indirectă. În scopul determinării oportunității aplicării în diagnosticul hemofiliei A a unor regiuni intragenice polimorfe, s-a realizat analiza molecular-genetică a informativității a 4 markeri polimorfi din structura genei *F8* la un grup de persoane sănătoase. Au fost selectate variantele bialelice HindIII intronul 19, AluI intronul 1 și tranziția G/A în intronul 7 (17P) (Tab. 3.3) și repetițiile multialelice din intronul 13.

Tabelul 3.3. Analiza markerilor polimorfi ai genei *F8* în grupul de persoane sănătoase din Republica Moldova

Polimorfism	Nivelul heterozigoției teoretice	Nivelul heterozigoției factoriale	Valoarea χ^2
HindIII intronul 19	0,385	0,365	0,2; 0,75>P >0,5
AluI intronul 1	0,498	0,55	0,81; 0,5>P >0,25
polim. G/A intronul 7	0,365	0,417	0,23; 0,75>P >0,5
repetiții (CA) _n intronul 13	0,64	0,50	3,83; 0,1>P>0,05

Conform datelor din tabelul 3.3, nivelul înalt de heterozigoție este caracteristic repetițiilor (CA)_n. O valoare destul de sporită a heterozigoției posedă și 3 polimorfisme bialelice. Între nivelul heterozigoției teoretice și factoriale nu s-au atestat diferențe statistic semnificative. Cu toate acestea, prezența asocierilor alelice între situsurile RFLP poate reduce semnificativ nivelul informațional general al lor. De aceea, în scopul determinării valorii dezechilibrului de *linkage*, s-a efectuat cercetarea asocierilor alelice (Tab. 3.4).

În cazul situsurilor HindIII/ I7P s-a depistat un dezechilibru puternic, demonstrat prin valorile înalte ale χ^2 și ale coeficienților de corelare (r) și *linkage*-ului inegal (D). O inegalitate semnificativă, dar nu totală, a fost determinată și pentru alte 2 combinații. În timpul cercetării comune a 3 situsuri bialelice la 48 femei, eficiența identificării heterozigoților a constituit 66%, adică a sporit nesemnificativ din cauza suplimentării polimorfismului G/A din intronul 7. Așadar, utilizarea acestui polimorfism este rațională doar în cazuri rare, când polimorfismele HindIII și AluI nu sunt informative.

Tabelul 3.4. Asocierile alelice între polimorfismele din interiorul genei *F8*.

Asocierea	Numărul de cromozomi	χ^2	D	r	P
HindIII/AluI	92	11,08	0,076	0,347	<0,01
I7P/HindIII	111	19,74	0,079	0,422	<0,01
I7P/AluI	60	6,29	0,069	0,324	<0,01

Ca rezultat al analizei repetițiilor microsatelitice (CA)_n din intronul 13, au fost depistate 6 alele ale situsului menționat care cuprind 19-24 repetiții. Alele cu 16-18 repetiții nu au fost detectate. În figura 3.7 sunt prezentate 3 alele ale repetițiilor (CA)_n. Cu frecvență majoră au fost depistate alelele (CA)₂₀ și (CA)₂₁: 0,54 și 0,22, respectiv. Alela (CA)₂₄ a fost cea mai rar atestată.

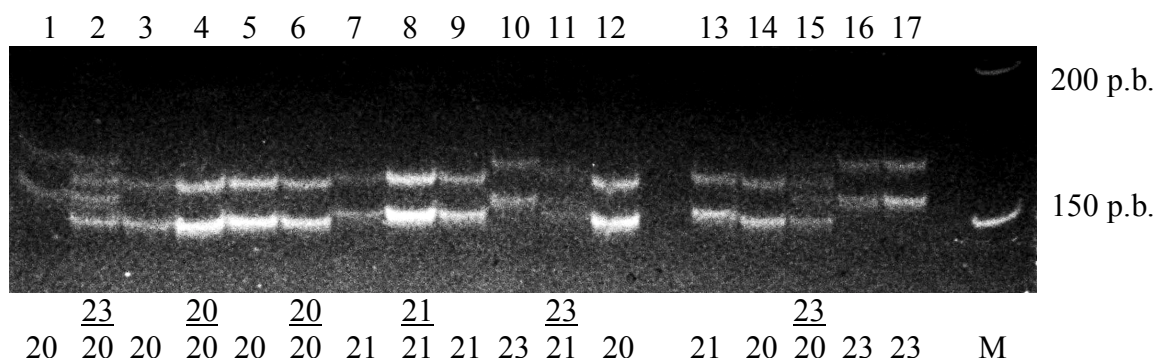


Fig. 3.7. Electroforegrama analizei ADN a alelelor microsatelitice (CA)_n ale genei *F8*, gel de poliacrilamidă 8% (19:1).

Trecurile 1, 3, 5, 7, 10, 12, 13, 16 – probe de ADN al bărbaților; 2, 4, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 17 – probe de ADN al femeilor; M – marker al lungimii (50 bp DNA ladder, Fermentas Ltd).

Conform datelor tabelului 3.5, alele mai frecvent depistate în grupul de control al populației din Moldova, predomină și în alte populații indoeuropene cercetate. În acest sens, populația chineză, cu preponderența alelelor cu numărul de repetiții 25 și 26, diferă mult.

Tabelul 3.5. Frecvențele alelelor corespunzătoare ale repetițiilor (CA)_n în intronul 13 al genei *F8* la diverse populații [22-24].

Numărul de repetiții (CA) _n	Europa %	China %	Rusia %	India %	Iran %	Turcia %	Moldova %
16	0,5	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-
18	0,5	-	-	1	0,9	-	-
19	7	-	3	-	5,2	1,8	7
20	45	-	56	53	45,8	51	54
21	29	-	19	36	36,2	34	22
22	11	1	11	-	8,2	7,8	10
23	5	1	10	10	1,7	4,3	5
24	1	9	-	-	0,9	0,8	2
25	-	53	-	-	-	-	-
26	-	32	-	-	-	-	-
27	-	3	-	-	-	-	-
28	-	1	-	-	-	-	-
HT	69	68	63	57	64	62	63,9
HF	91	53,7	34	56	52	50	50

HT — nivelul heterozigotiei teoretice, HF – nivelul heterozigotiei factoriale

Heterozigoția factorială 0,50, statistic este similară cu cea teoretică: 0,64, calculată în baza legii Hardy-Weinberg ($\chi^2=3,83$; $0,1>P>0,05$). Coeficientul de variație a constituit 0,21. Cercetarea comună a repetițiilor (CA)_n cu 3 regiuni bialelice la 48 femei a condus la sporirea cazurilor de depistare a heterozigoților cu 13,2%, și a constituit 79,2%.

Așadar, cercetarea frecvenței de repartizare a 4 situsuri polimorfe a permis relevarea a 3 regiuni cu nivel informațional înalt: HindIII/intronul 19, AluI/intronul 1 și repetițiile (CA)_n în intronul 13. Datele obținute demonstrează oportunitatea utilizării situsurilor menționate în calitate de markeri genetici în diagnosticul hemofiliei A, inclusiv la identificarea purtătoarelor heterozigote și în diagnosticul prenatal.

3.3 Aplicarea practică a analizei ADN la familiile cu hemofilia A

Situsurile polimorfe menționate ale genei *F8* au fost utilizate pentru investigarea a 73 femei din familii cu hemofilia A [25-28]. Analiza comună a mutațiilor și a situsurilor polimorfe a permis depistarea defectului sau a markerului genetic la 92% familii (56/61).

În figura 3.8 este prezentat algoritmul elaborat în scopul cercetării familiilor afectate de hemofilia A, care a făcut posibilă identificarea a 85,7% mutații în gena *F8* la bolnavii cu diagnosticul de hemofilia A.

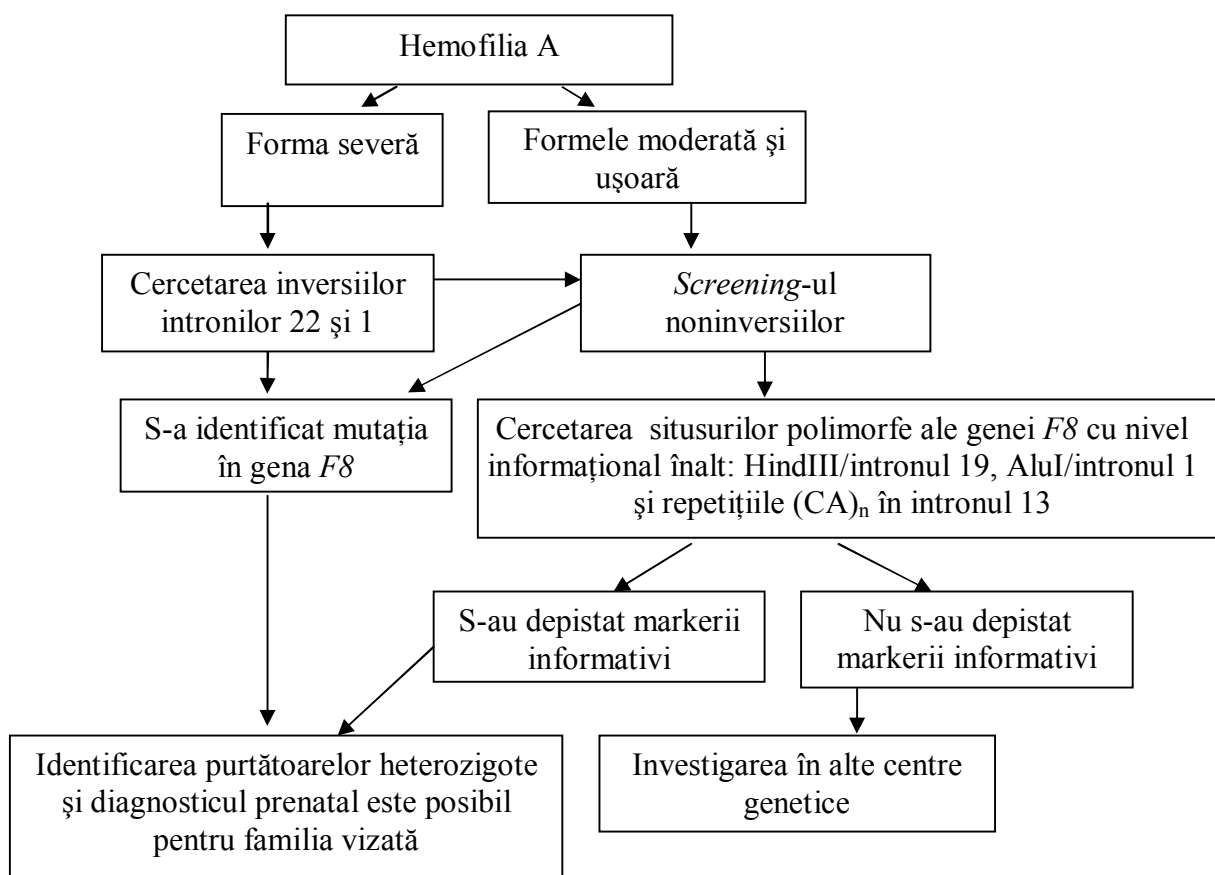


Fig.3.8. Algoritmul investigațiilor molecular-genetice în familiile cu hemofilia A.

Algoritmul propus a fost utilizat pentru determinarea statutului de purtător la femeile din familiile cu risc. Din 23 mame ale pacienților cu hemofilie A sporadică, 22 au fost diagnosticate ca purtătoare. Din 24 de rude de sex feminin de pe linia maternă a pacienților, statutul de purtător a fost determinat la 13. În 2 cazuri statutul de purtător a fost stabilit în rezultatul investigării situsurilor polimorfe.

Diagnosticul prenatal a cuprins cercetarea mutațiilor anterior depistate în familie și/sau analiza situsurilor polimorfe ale genei *F8*. Au fost efectuate 5 teste de diagnostic prenatal: 2 ale fătului de sex feminin și 3 – masculin, dintre care 2 fetusuri de sex masculin au fost afectați.

S-a identificat grupul de pacienți cu riscul sporit de apariție a inhibitorilor aloimuni ai factorului VIII ca rezultat al tratamentului cu concentratele factorului menționat. Grupul e constituit din 22 persoane (17 cu inversii, 2 cu deleții majore și 3 cu mutațiile *nonsense*). Riscul de apariție a inhibitorilor este determinat de tipul mutației și de localizarea acesteia.

4. ANALIZA MOLECULARĂ A POLIMORFISMULUI GENEI *F9* LA BOLNAVII CU HEMOFILIE B ȘI LA GRUPUL DE PERSOANE SĂNĂTOASE DIN MOLDOVA

4.1 Cercetarea molecular-genetică a genei *F9* la pacienții cu hemofilie B

În scopul depistării mutațiilor, s-a cercetat ADN al 9 pacienți din 5 familii cu hemofilie B. La toți pacienții investigați s-a diagnosticat forma severă a hemofiliei cu nivelul factorului IX mai mic de 1%. Mutațiile au fost identificate prin secvențierea regiunii codificatoare a genei *F9*, promotorului, regiunii 5', situsurilor *splicing*-ului și regiunii 3'.

Tabelul 4.1. Mutațiile genei *F9*

№	Exon/ intron	Tipul mutației	Substituiția nucleotidică	Mutația [§]	Moștenirea
1	i7	ASJ	c.867-4A>G (A→G ³⁰⁸¹⁸)		F
2	i1	ASJ	c.118-2A>C* (A→C ⁶³²⁴)		F
3	i5	ASJ	c.550-1G>A* (G→A ²⁰³⁶²)		S
4	e8-3'	M	c.1266G>A (G→A ³¹²²⁰)	p.Gly367Arg	F
5	e8-3'	Fs	c.1401delA (ΔA ³¹³⁵⁵)	p.Thr412GlnfsX25	F

ASJ – mutația situsului acceptor al *splicing*-ului, M – mutația *missense*, Fs – mutația *frameshift*, * o mutație nouă. În paranteze este indicată numerotarea nucleotidelor conform Yoshitake et al. [6], § numerotarea aminoacizilor este prezentată conform nomenclaturii utilizate în baza de date a hemofiliei B. F – caz familial al hemofiliei, S – caz sporadic.

Au fost identificate 3 mutații ale situsului acceptor al *splicing*-ului, o mutație *missense* și 1 – *frameshift*, dintre care 2 mutații sunt noi, nedescrise în baza de date a hemofiliei B. La fiecare pacient s-a depistat doar o mutație (Tab. 4.1.)

4.2 Siturile polimorfe ale genei *F9* la grupul de persoane sănătoase din Republica Moldova

Pentru a demonstra raționalitatea utilizării a 5 situruri polimorfe ale genei *F9* în scopul diagnosticului hemofiliei B, s-a realizat analiza molecular-genetică a informativității markerilor investigați (Tab. 4.2).

Cercetarea comună a situsurilor DdeI, MseI, HhaI, MnlI și TaqI a permis relevarea markerului genetic heterozigotic pentru 16 din 17 femei investigate, ceea ce presupune că diagnosticul indirect al hemofiliei B va fi eficient în 94% cazuri.

Tabelul 4.2. Analiza markerilor polimorfi ai genei *F9* în grupul de persoane sănătoase din Republica Moldova

Polimorfism	Nivelul heterozigoției teoretice	Nivelul heterozigoției factoriale	Valoarea χ^2
DdeI intronul 1	0,449	0,647	3,0; 0,1>P >0,05
MseI regiunea 5'	0,427	0,533	1,71; 0,25>P >0,1
HhaI regiunea 3'	0,461	0,50	0,17; 0,75>P >0,5
MnlI exonul 6	0,449	0,421	0,21; 0,75>P >0,5
TaqI intronul 4	0,394	0,435	0,17; 0,75>P >0,5

Totodată, s-au calculat valorile asocierilor alelice pentru toate combinațiile posibile de markeri polimorfi (Tab. 4.3), ceea ce poate reduce nivelul informativității generale. Conform datelor prezentate în tabel, asocierile ne semnificative au fost atestate în cazul situsurilor MseI/MnlI și MseI/TaqI, cât și un *linkage* puternic, dar nu complet, între MnlI și TaqI. Ținând cont de rezultatele obținute, dar și de valorile heterozigoției factoriale și teoretice ale regiunilor intragenice polimorfe în lotul martor, utilizarea combinațiilor situsurilor DdeI, MseI și HhaI s-a dovedit a fi cea mai rațională pentru diagnosticul indirect al hemofiliei B în Republica Moldova. În cazurile, când aceste situruri sunt neinformative, investigațiile pot fi completate prin includerea în studiu a situsurilor TaqI și MnlI.

Tabelul 4.3. Asocierile alelice ale situsurilor polimorfe din structura genei *F9*.

Asociere	Număr de cromozomi	χ^2	D	r	P
DdeI/MseI	33	1.79	0.051	0.230	>0.1
DdeI/HhaI	46	0.56	0.025	0.108	>0.1
DdeI/MnlI	25	2.03	0.064	0.285	>0.1
DdeI/TaqI	39	2.67	0.055	0.261	>0.1
MseI/HhaI	47	0.74	0.028	0.126	>0.1
MseI/MnlI	24	4,42	0,094	0,429	<0.1
MseI/TaqI	35	3,95	0,069	0,336	<0.1
HhaI/MnlI	42	0,235	0,017	0,127	>0.1
HhaI/TaqI	49	0,907	0,029	0,136	>0.1
MnlI/TaqI	29	11,42	0,132	0,627	<0.01

4.3 Aplicarea practică a analizei ADN la familiile cu hemofilia B

Genotiparea realizată pentru familiile afectate de hemofilia B a permis identificarea mutațiilor în toate cele 5 cazuri cercetate. Familiile menționate au mai fost supuse analizei regiunilor intragenice polimorfe, care a relevat cel puțin un marker genetic informativ pentru fiecare familie în parte [29, 30]. Diagnosticul prenatal al hemofiliei B a fost efectuat de 2 ori. S-a stabilit că fătul de sex feminin nu posedă statutul de purtător al hemofiliei B, pe când fătul masculin s-a dovedit a fi afectat.

Ca rezultat al analizei datelor privind genotiparea mutațiilor și cercetarea situsurilor polimorfe, s-a elaborat algoritmul de investigare a familiilor afectate de hemofilia B (Fig. 4.1), care permite depistarea a până la 100% mutații în gena ce codifică factorul IX la bolnavii cu diagnosticul de hemofilia B.

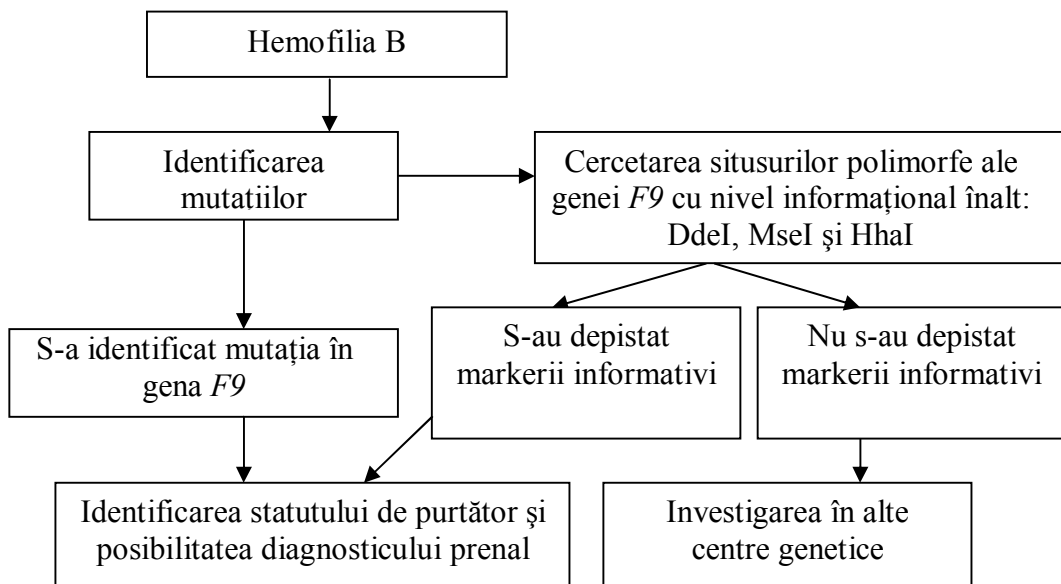


Fig.4.1. Algoritmul investigațiilor molecular-genetice ale familiilor cu hemofilia B.

CONCLUZII GENERALE

1. Cercetările efectuate au condus la depistarea și caracterizarea a 15 mutații noi ale genei *F8* și 2 ale genei *F9*. Conform prelucrării bioinformatică și a datelor contemporane privind interacțiunile structural-funcționale ale factorului VIII, s-a prezentat interpretarea efectelor patologice a 7 mutații *missense* noi ale genei *F8*. Ca rezultat al analizei noilor mutații s-au obținut informații suplimentare referitor la bazele moleculare ale hemofiliei A și B.
2. S-a identificat un grup, constituit din 22 de pacienți (17 pacienți cu inversii, 2 – cu deleții majore și 3 – cu mutații *nonsense*), care prezintă riscul sporit de dezvoltare a inhibitorilor

aloimuni la factorul VIII ca rezultat al administrării concentratelor factorului menționat pentru tratamentul hemofiliei A.

3. S-a efectuat analiza moleculară a 4 loci polimorfi ai genei *F8*, cu scopul determinării raționalității utilizării acestora în diagnosticul hemofiliei A. S-au identificat 3 situsuri polimorfe cu nivel informațional înalt: HindIII/intron 19, AluI/intron 1 și repetiții $(CA)_n$ în intronul 13, pentru care gradul sumar al heterozigoției constituie aproximativ 76% .

4. În cadrul analizei moleculare a 5 situsuri polimorfe ale genei *F9*, au fost selectate 3 situsuri cu nivel informațional înalt: DdeI, MseI și HhaI, utilizarea cărora permite diagnosticul maladiei și identificarea femeilor purtătoare ale hemofiliei B în 82,3% cazuri. Lipsa asocierilor preferențiale a fost stabilită pentru majoritatea combinațiilor posibile ale alelelor polimorfe.

5. S-au elaborat algoritmi de diagnostic care permit identificarea a circa 85% mutații în gena *F8* și până la 100% mutații în gena *F9* la bolnavii afectați de hemofilia A sau B, respectiv. Utilizarea combinată a analizei directe și indirecte a genelor menționate permite determinarea statutului de purtător și efectuarea diagnosticului prenatal la peste 91% familii.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. La identificarea pacienților cu hemofilie, se recomandă efectuarea diagnosticului genetic. Femeile de risc înalt trebuie să fie investigate în scopul depistării mutației sau a markerului genetic informativ pentru utilizarea ulterioară a rezultatelor în cadrul diagnosticului prenatal limitat în timp.

2. Bolnavii de hemofilie A cu inversiile, delețiile majore și mutațiile *nonsense* în exonii 14-26, la primele simptome de reducere a eficienței tratamentului cu concentratele de factor VIII, se recomandă a fi investigați întru depistarea inhibitorilor factorului VIII.

BIBLIOGRAFIE

1. Kemball-Cook G. The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site. <http://europium.csc.mrc.ac.uk/> (vizitat 29.11.2009)

2. Bowen D.J. Haemophilia A and B: molecular insights. In: Molecular Pathology, 2002; vol. 55, p. 127-144.

3. Green P. Haemophilia B mutation database, Version 13. <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html> (vizitat 29.11.2009).

4. Sommer S.S. et al. Missence mutations and the agnitude of functional deficit: the example of factor IX. In: Human Genetics, 1992, vol. 89, p. 295-297.

5. Gitschier J. et al. Characterization of the human factor VIII gene. In: Nature, 1984, vol.312, p. 326-330.

6. Yoshitake S. et al. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). In: *Biochemistry*, 1985, vol. 24, p. 3736-3750.
7. Liu Q., Nozari G., Sommer S.S. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A [letter]. In: *Blood*, 1998, vol. 92, p. 1458-1459.
8. Bagnall R.D. et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. In: *Blood*, 2002, vol. 99, p. 168-174.
9. Dogan R.I. et al. SplicePort-An interactive splice-site analysis tool. In: *Nucleic Acids Research*, 2007, vol. 35, p. W285-W291.
10. **Șirocova N.** și al. Utilizarea metodelor biochimice și molecular-genetice în diagnosticul hemofiliei în R. Moldova. În: *Buletin de Perinatologie*, 2009, nr. 3, p.228-232.
11. **Sirocova N.**, Nakaya S., Thompson A.R. Molecular testing of hemophilia A in Moldovan patients. In: *Haematologica*, 2005, vol. 90, suppl. 2, p. 204.
12. **Sirocova N.** et al. Factor VIII (F8) genotyping of Moldovan hemophilia A patients. In: *Haemophilia*, 2008, vol. 14, suppl. 2, p. 70.
13. **Sirocova N.** et al. Factor VIII mutations in 42 Moldovan haemophilia A families, including 12 that are novel. In: *Haemophilia*, 2009, vol. 15, p. 942-951.
14. Fay P.J. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. In: *Blood Reviews*, 2004, vol. 18, p. 1-15.
15. Koszelak M.E., Huggins C.F., Fay P.J. Sites in A2 subunit involved in the interfactor VIIIa interaction. In: *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, p. 27137-27144.
16. Hsu T.C., Pratt K.P., Thompson A.R. The factor VIII C1 domain contributes to platelet binding. In: *Blood*, 2008, vol. 111, p. 200-208.
17. Oldenburg J., Ananyeva N.M., Saenko E.L. Molecular basis of haemofilia A. In: *Haemofilia*, 2004, vol.10 (suppl.4), p. 133-139.
18. Santocroce R. et al. Identification of 217 unreported mutations in the F8 gene in the group of 1410 unselected Italian patients with hemophilia A. In: *Journal of Human Genetics*, 2008, vol. 53, p. 275-284.
19. Ahmed R. et al. Identification of 32 novel mutations in the factor VIII gene in Indian patients with hemophilia A. In: *Haematologica*, 2005, vol. 90, p. 283-284.
20. Rossetti L.C. et al. Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of the severe molecular defects. In: *Haematologica*, 2007, vol. 92, p. 842-845.

21. **Широкова Н.**, Барбакар Н. Молекулярные основы гемофилии А: взаимосвязь между генотипом и фенотипом. În: Materiale conferinței științifică internațională „Învățământul superior și cercetarea”, 2006, p. 343-344.
22. Lalloz M.R. et al. Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. In: Lancet, 1991, vol. 338, p. 207-211.
23. Jarjanazi H. et al. Analysis of the two microsatellite repeat polymorphisms of the factor VIII gene in the Turkish population. In: British Journal of Haematology, 1998, vol. 100, p. 589-593.
24. Rabbani B. et al. Analysing two dinucleotide repeats of FVIII gene in Iranian population. In: Haemophilia, 2007, vol. 13, p. 740-744.
25. **Șirocova N.**, Țurea V., Sacară V. Diagnosticul ADN familiilor cu hemofilia A. În: Buletin de Perinatologie, 2004, nr. 2-3, p. 159.
26. **Șirocova N.** The FVIII gene polymorphisms in Moldovan patients with hemophilia A. In: European Journal of Human Genetics, 2006, vol. 14, suppl. 1, p. 305.
27. **Широкова Н.** Молекулярное исследование локуса AluI/intron1 гена FVIII для диагностики гемофилии А в Молдове. В: Материалы Международной Конференции «Генетика в России и мире», 2006, с. 218.
28. **Șirocova N.** Studiarea locilor polimorfe ale genei factorului VIII în diagnosticul hemofiliei A în Moldova. În: Buletin de Perinatologie, 2006, nr. 4, p. 41-42.
29. **Șirocova N.** și al. Polimorfismele genei factorului IX în populația Moldovei. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. Revista Științifico-Practică, 2008, nr. 5, p. 248-250.
30. **Șirocova N.** Importanța metodelor molecular-genetice în diagnosticul hemofiliei A și B în Moldova. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. Revista Științifico-Practică, 2007, nr. 2, p. 190-193.

ADNOTARE

Șirocova Natalia, «Studierea polimorfismului genelor *F8* și *F9* la pacienții cu hemofilie A și B în Republica Moldova». Teză de doctor în biologie, Chișinău 2010. Teza constă din: Introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie din 159 titluri, 5 anexe, 96 pagini de text de bază, 12 tabele și 29 figuri. Rezultatele obținute sunt publicate în 11 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: hemofilie, genele *F8* și *F9*, factorii VIII și IX, genotip, mutație, polimorfism, diagnostic molecular.

Domeniul de studiu: 03.00.15 – genetică

Scopul lucrării: efectuarea analizei molecular-genetice a genelor *F8* și *F9* în familiile cu hemofilie A și B.

Obiectivele: crearea băncii de ADN al familiilor cu hemofilie A și B, analiza succesiunii codificatoare și a regiunilor conexiunii exon-intronice ale genelor *F8* și *F9* la pacienții cu hemofilie A și B, analiza polimorfismelor genelor studiate și estimarea nivelului asocierilor alelice ale regiunilor intragenice polimorfe, elaborarea algoritmului de diagnostic molecular pentru profilaxia hemofiliei A și B în Republica Moldova.

Noutatea științifică. Pentru prima dată la pacienții cu hemofilie A și B din Republica Moldova s-au obținut date despre spectrul și frecvența mutațiilor în genele *F8* și *F9*, s-au identificat 17 mutații noi, nedescrise pînă la moment. S-au obținut date privind repartizarea alelelor situsurilor polimorfe ale genelor *F8* și *F9* la lotul martor și s-a determinat nivelul asocierilor alelice ale regiunilor intragenice.

Semnificația teoretică. Rezultatele obținute completează cunoștințele existente despre bazele moleculare ale hemofiliei și despre consecințele funcționale ale mutațiilor în genele ce codifică factorii de coagulare.

Valoarea aplicativă. A fost creată banca de ADN al pacienților și membrilor familiilor cu hemofilie A și B (198 mostre). Au fost identificate mutațiile genelor *F8* și *F9* în Republica Moldova. S-au elaborat algoritmi de diagnostic care permit identificarea pînă la 85,7% mutații în gena *F8* și pînă la 100 % în gena *F9* la bolnavii afectați cu hemofilie A sau B. Datele obținute sunt utilizate pentru determinarea pacienților cu hemofilie A cu risc înalt de apariție a inhibitorilor aloimuni, purtătoarelor de boală și în diagnosticul prenatal.

Rezultatele obținute sunt implementate în practica consultului genetic privind hemofilia din cadrul Centrului Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală.

АННОТАЦИЯ

Широкова Наталия, «Исследование полиморфизма генов *F8* и *F9* у пациентов с гемофилией А и В в Республике Молдова». Диссертация на соискание степени доктора биологических наук, Кишинев, 2010. Диссертация содержит: Введение, 4 главы, выводы и практические рекомендации, библиографию из 159 источников, 5 приложений, 96 страниц основного текста, 12 таблиц, 29 рисунков. Полученные результаты опубликованы в 11 научных работах.

Ключевые слова: гемофилия, гены *F8* и *F9*, факторы VIII и IX, генотип, мутации, полиморфные локусы, молекулярная диагностика.

Область исследований: 03.00.15 – генетика

Цель работы: проведение молекулярно-генетического анализа генов *F8* и *F9* в семьях с гемофилией А и В.

Задачи: создание банка ДНК семей с гемофилией А и В, исследование кодирующей области и областей экзон-интронных соединений генов факторов VIII и IX у пациентов с гемофилией А и В, изучение полиморфизмов данных генов и определение аллельной ассоциации между полиморфизмами, разработка эффективной схемы молекулярной диагностики для профилактики гемофилии А и В в Республике Молдова.

Научная новизна. Впервые для пациентов с гемофилией А и В в Республике Молдова получены данные о спектре и частоте мутаций в генах *F8* и *F9*, обнаружено 17 ранее не описанных мутаций. Получены данные по распределению аллелей полиморфных локусов и определена степень аллельных ассоциаций между полиморфизмами внутри генов.

Теоретическая значимость. Полученные результаты расширяют представления о молекулярной природе гемофилии и функциональных последствиях мутаций в генах факторов свертывания.

Практическая значимость. Создан банк ДНК больных и членов семей с гемофилией А и В (198 образцов). Выявлены мутации генов *F8* и *F9* в РМ. Разработана диагностическая схема, позволяющая идентифицировать до 85,7% мутаций в гене *F8* и до 100 % в гене *F9* у больных с диагнозом гемофилия А или В. Полученные данные применены для выявления больных группы риска развития аллоиммунных ингибиторов при гемофилии А, определения носительниц заболевания и пренатальной диагностики.

Полученные научные результаты внедрены в практику генетического консультирования гемофилии в Национальном Центре Репродуктивного Здоровья и Медицинской Генетики.

SUMMARY

Sirocova Natalia, «Study of the *F8* and *F9* genes in patients with hemophilia A and B in the Republic of Moldova». A thesis of Doctor in Biology, Chisinau, 2010. The thesis consists of introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, 159 bibliographic sources, 5 annexes, 96 pages, 12 tables and 29 pictures. The obtained results have been published in 11 scientific papers.

Key words: hemophilia, *F8* and *F9* genes, coagulation factors VIII and IX, genotype, mutations, polymorphic loci, molecular diagnosis.

Research field: 03.00.15 – Genetics

Research goal: molecular analysis of the *F8* and *F9* genes in families with hemophilia A and B.

Aims: to create a DNA bank of families with hemophilia A and B, to analyze coding regions and exon-intron junctions of the *F8* and *F9* genes in patients with hemophilia A and B, to study polymorphic loci of the genes and to identify allelic associations between loci within genes, to develop molecular diagnostics laboratory system for prophylaxis of hemophilia A and B in Moldova.

Scientific innovation. For the first time in Moldovan patients with hemophilia A and B the spectrum of mutations in the *F8* and *F9* genes and their frequency were determined, 17 novel mutations were identified. Data regarding allele desdistribution and linkage disequilibrium of polymorphic loci within these genes was obtained.

Theoretical significance. New data that enlarge molecular insights of hemophilia was gained. Novel missense mutations were characterized based on current knowledge of factor VIII crystal structure.

Practical importance. There was created a DNA bank of patients with hemophilia and their family members (198 samples). Mutations in the *F8* and *F9* genes were identified. The elaborated molecular diagnostics system permits to detect up to 85,7% mutations in the *F8* gene and 100% – in *F9* gene. The obtained results allow the identification of at-risk alloimmune inhibitor patients with hemophilia A, female carries and were used in prenatal diagnosis.

The obtained results are implemented for hemophilia genetic counseling at the National Center of Reproductive Health and Medical Genetics.

ȘIROCOVA NATALIA

**STUDIAREA POLIMORFISMULUI GENELOR *F8* ȘI *F9* LA
PACIENȚII CU HEMOFILIE A ȘI B ÎN REPUBLICA MOLDOVA**

03.00.15 – GENETICĂ

Aprobat spre tipar: 07.04.2010
Hârtie ofset. Tipar ofset.
Coli de tipar: 1,0 coli de autor

Formatul hârtiei 60x84 1/16
Tiraj 40 ex.
Comanda nr. 22881

Primex Com, str. București 59, Chișinău