

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА
ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

На правах рукописи

УДК: 575.224.2; 575.113.2; 577.21

ШИРОКОВА НАТАЛИЯ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *F8* И *F9* У
ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОФИЛИЕЙ А И В
В РЕСПУБЛИКЕ МОЛДОВА**

03.00.15 - ГЕНЕТИКА

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологии

КИШИНЕВ, 2010

Работа выполнена в лаборатории *Молекулярной Генетики* Института Генетики и Физиологии Растений, А.Н.М. и в лаборатории *Молекулярной Генетики Человека* Национального Центра Репродуктивного Здоровья и Медицинской Генетики.

Научный руководитель:

Барбакар Николай, доктор хабилитат биологии, профессор исследователь

Научный консультант:

Цуря Валентин, доктор хабилитат медицины, конференциар-университар

Официальные оппоненты:

Дука Мария, доктор хабилитат биологии, профессор университет, член-корреспондент, Университет А.Н.М.

Чемортан Игорь, доктор биологии, конференциар-университар, ГУМФ им. Н. Тестемицану

Члены Специализированного Ученого Совета:

Лупашку Галина, председатель, доктор хабилитат биологии, конференциар-исследователь;

Котенко Евгения, ученый секретарь, доктор биологии, конференциар-исследователь;

Букэтару Николай, доктор хабилитат биологии, профессор университет;

Курочкин Геннадий, доктор хабилитат медицины, конференциар-университар;

Туманова Лидия, доктор химии, конференциар-исследователь.

Защита состоится 20 мая 2010, в 10⁰⁰, на заседании Специализированного Ученого Совета ДН 10.03.00.15-11 Института Генетики и Физиологии Растений, А.Н.М., MD 2002, мун. Кишинэу, ул. Лесная, 20; тел.: (+373 22) 770447, факс: (+373 22) 556180.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Института Генетики и Физиологии Растений, А.Н.М. и на web-странице С.Н.А.А. (www.cnaa.md).

Автореферат разослан 15 апреля 2010.

Секретарь Специализированного Ученого Совета

Котенко Евгения, доктор биологии, конференциар-исследователь

Научный руководитель

Барбакар Николай, доктор хабилитат биологии, профессор исследователь

Научный консультант

Цуря Валентин, доктор хабилитат медицины, конференциар-университар

Автор

Широкова Наталия

(© Широкова Наталия, 2010)

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Гемофилии А и В (MIM#306700, MIM#306900) являются наиболее частыми и тяжелыми заболеваниями системы свертывания крови, возникающими в результате мутаций в генах фактора VIII (*F8*) и фактора IX (*F9*), соответственно. Частота во всех исследованных популяциях составляет примерно 1:5000-10000 мальчиков в случае гемофилии А и 1:30000 в случае гемофилии В. В связи с успехами в лечении, в последнее время было установлено увеличение числа пациентов и носительниц гемофилии, что ведет к накоплению патологических генов в популяции. К сожалению, исследование коагуляционной активности фактора VIII или фактора IX не может быть использовано для установления носительства. В связи с этим молекулярно-генетическое тестирование стало важным этапом в определении наличия или отсутствия мутантных генов у потенциальных носительниц, а в случае подтверждения статуса, и в пренатальной диагностике.

Описание ситуации в области исследования и определение проблем исследования. В генах фактора VIII и фактора IX были обнаружены точечные мутации, инсерции, делеции, перегруппировки или инверсии. Более 1200 различных мутаций гена фактора VIII были идентифицированы и описаны в базе данных по гемофилии А HAMSTeRS (The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site) как являющиеся причиной заболевания [1]. Мажорной мутацией в гене фактора VIII, встречающейся примерно у половины пациентов с гемофилией А, является инверсия интрона 22, у 3% обнаруживается инверсия интрона 1, в то время, как у оставшейся половины выявлены нонсенс-, миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания или протяженные генные замены, включающие крупные делеции и инсерции. Миссенс-мутации в экзонах, кодирующих три А домена и два С домена, преобладают среди пациентов с легкой формой гемофилии А [2].

Более 1000 мутаций гена фактора IX зарегистрированы в базе данных по гемофилии В [3]. Крупные частичные делеции или делеции всего гена фактора IX, протяженные генные замены, замены сайтов сплайсинга, нонсенс-, миссенс-мутации и мутации со сдвигом рамки считывания при гемофилии В влияют на тяжесть фенотипа в гораздо большей мере, чем при тяжелой форме гемофилии А. Средняя и легкая формы гемофилии В в большинстве случаев ассоциированы с миссенс-мутациями [4]. Различные мутации обуславливают вариации в тяжести клинических проявлений заболевания.

В связи с высокой частотой, осложнениями при лечении и тяжелой инвалидизацией при гемофилии необходима разработка эффективной схемы молекулярно-генетической

диагностики для профилактики данного заболевания в семьях высокого риска, что является мотивацией логического обоснования для проведения предложенного исследования.

Цель исследования. Целью данного исследования было проведение молекулярно-генетического анализа генов *F8* и *F9* у пациентов с гемофилией А и В и членов их семей.

Задачи исследования:

1. Создать банк ДНК пациентов с гемофилией и членов их семей.
2. Провести молекулярно-генетическое исследование кодирующих последовательностей и областей экзон-интронных соединений генов *F8* и *F9* у пациентов с гемофилией А и В.
3. Изучить полиморфизм STR (shot tandem repeats) и ПДРФ (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) локусов генов *F8* и *F9* в контрольной выборке и в семьях с гемофилией А и В, провести оценку степени аллельной ассоциации полиморфных локусов каждого из генов.
4. Разработать эффективную схему молекулярной диагностики гемофилии А и В для Республики Молдова.

Методология исследования включает применение различных методов ПЦР, гетеродуплексного и рестрикционного анализов, определение первичной структуры ДНК по методу Сэнгера, для оценки достоверности статистических данных использовался критерий χ^2 .

Новизна и оригинальность исследования. Впервые у больных с гемофилией А и В в Республике Молдова (РМ) проведено молекулярно-генетическое исследование всей кодирующей последовательности и областей экзон-интронных соединений генов *F8* и *F9*. Получены данные о спектре и частоте мутаций.

Обнаружены ранее не описанные мутации:

в гене *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.

в гене *F9* – c.118-2A>C, c.550-1G>A

Получены данные по распределению аллелей полиморфных локусов генов *F8* и *F9* в контрольной выборке 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 ценность. Создан банк ДНК пациентов с гемофилией А и В и членов их семей. Проведено исследование по выявлению мутаций генов *F8* и *F9* в РМ.

Разработана диагностическая схема, позволяющая выявлять до 85,7% мутаций в гене *F8* и до 100 % в гене *F9* у больных с диагнозом гемофилия А или В. Предложенная схема может быть использована как для определения статуса носительства у женщин высокого риска, так и для пренатальной диагностики, что является важным этапом эффективного медико-генетического консультирования и профилактики данной наследственной патологии.

Среди изученных семей, для 39 женщин высокого риска определен статус носительства гемофилии, в 7 семьях проведена пренатальная диагностика.

С введением в Республике Молдова препаратов факторов VIII и IX в практику лечения гемофилии данные о генотипе пациентов позволят определять ассоциированный риск развития аллоиммунных ингибиторов и разработать программу иммунотолерантной терапии для эффективного лечения.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Обнаружены 15 новых мутаций гена *F8* и 2 новые мутации гена *F9*. Дана интерпретация 7 новых миссенс-мутаций.
2. Выявлены 3 высокоинформативных полиморфизма для диагностики гемофилии А - это *HindIII*/интрон 19, *AluI*/интрон 1 и $(CA)_n$ повторы в интроне 13.
3. Определены высокоинформативные полиморфизмы *DdeI*, *MseI* и *NhaI* для диагностики гемофилии В.
4. Разработаны диагностические алгоритмы, позволяющие выявлять более 85% мутаций в гене *F8* и до 100% мутаций в гене *F9* у больных с диагнозом гемофилия А или В.

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

Апробация результатов. Материалы данного исследования были представлены на: Заседании специализированного учёного совета ИГФР (2009), Конгрессе Европейской Ассоциации Гематологов (Стокгольм, 2005), Международной Конференции «Генетика в России и мире» (Москва, 2006), Международной научной конференции „Învăţământul superior şi cercetare” (Кишинев, 2006), Европейской Конференции по Генетике Человека

(Амстердам, 2006), Конгрессе Всемирной Федерации Гемофилии (Стамбул, 2008), Обществе Педиатров (Кишинев, 2008), Конгрессе Педиатров и Неонатологов (Кишинев, 2009)

Работа была проведена при финансовой поддержке фондов MRDA и CRDF, грант MTFR-04-10.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, включая 5 статей в национальных и международных рецензируемых журналах, 6 тезисов докладов на национальных и международных конференциях.

Структура и объем работы. Материалы диссертационной работы изложены на 96 страницах основного текста, содержат введение, 4 главы, заключение, выводы и практические рекомендации, библиографию из 159 источников, 5 приложений, иллюстрированы 12 таблицами и 29 рисунками.

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА ГЕМОФИЛИИ

Факторы VIII и IX участвуют в процессе свертывания крови и активируются во время гемостатических нарушений, через внутренний или внешний механизмы. Гемофилия является результатом мутаций в генах, кодирующих факторы свертывания.

Ген *F8* локализован в дистальном диске длинного плеча X-хромосомы Xq28, содержит 26 экзонов и его длина составляет ~ 186 т.п.о. [5]. Первичная структура гена *F9* описана Yoshitake с соавторами в 1985 году [6]. Ген *F9* значительно меньше гена *F8*, около 34 т.п.о., и содержит 8 экзонов. Ген также локализован на конце длинного плеча X-хромосомы и расположен более центрально, в положении Xq27. Гены факторов VIII и IX находятся на значительном расстоянии друг от друга, и сцепления между ними не наблюдается. Для молекулярной диагностики гемофилии используется прямое исследование ДНК, включающее непосредственную идентификацию патологической мутации в генах *F8* или *F9*. Если мутация в генах *F8* или *F9* по каким-либо причинам не может быть идентифицирована, тогда используют косвенное исследование гена или анализ сцепления для определения аллеля, связанного с заболеванием.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

В качестве материала для молекулярно-генетических исследований использовали препараты геномной ДНК 80 пациентов из 61 семьи с гемофилией А и 9 пациентов из 5

семей с гемофилией В, а также ДНК 109 членов их семей. В качестве контроля использовалась геномная ДНК 65 человек из выборки здорового населения Республики Молдова. Для пренатальной диагностики были исследованы 7 препаратов фетальной ДНК, забор которых осуществлялся при процедуре биопсии хориона или амниоцентеза. Процедура секвенирования ДНК проводилась в лаборатории др. А.Р. Томпсона, визуализирование сайтов миссенс-мутаций на уровне кристаллической структуры фактора VIII было сделано др. К. Пратт, Puget Sound Blood Center, Сиэтл, США.

2.2 Методы исследования

Геномную ДНК выделяли с помощью протеиназы К и фенольно-хлороформной экстракции. Наличие инверсии интрона 22 определяли в результате ПЦР длинных фрагментов как описано в [7]. Инверсия интрона 1 исследовалась при помощи ПЦР [8].

Кодирующие последовательности генов *F8* и *F9*, включая фланкирующие последовательности, амплифицировали с использованием соответствующих праймеров. Для образования гетеродуплексов смешивали 5 мкл продуктов амплификации соответствующих экзонов пациента и контроля, затем проводили денатурацию и медленную ренатурацию, используя программу: 94°C - 3 мин, 80°C - 2 мин, 70°C - 2 мин, 65°C - 15 мин, 50°C - 5 мин, 40°C - 2 мин и 37°C - 15 мин, после чего наносили на 1хMDETM гель. Образцы, которые показывали отличную от контроля миграцию, подвергали автоматическому секвенированию на приборе Genetic Analyzer, модель 3100 (Applied Biosystems, USA), согласно протоколу фирмы-производителя. Мутации подтверждали секвенированием ДНК другого больного из той же семьи или носительницы, предсказанной рестрикцией или повторным секвенированием другого амплифицированного фрагмента ДНК пациента.

Оценка мутационных изменений в сайтах сплайсинга была проведена при помощи компьютерного софта «SplicePort» [9]. Влияние миссенс-мутаций на строение и функциональную активность фактора VIII определялось при помощи программного обеспечения PolyPhen и CUPSAT.

Регистрацию аллелей полиморфных сайтов проводили после амплификации соответствующих участков и рестрикционного анализа с последующим разделением в полиакриламидном геле (ПААГ). В зависимости от требуемого разрешения использовался ПААГ от 6% до 12%.

Статистический анализ проводили с использованием критерия χ^2 .

3. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *F8* В СЕМЬЯХ С ГЕМОФИЛИЕЙ А И В ВЫБОРКЕ ЗДОРОВОГО НАСЕЛЕНИЯ.

3.1 Молекулярный анализ мутаций гена *F8* у больных с гемофилией А

Для идентификации мутаций, являющихся причинами заболевания, мы исследовали ДНК 75 пациентов из 57 семей с гемофилией А. Тяжесть заболевания определялась по данным количественного исследования фактора VIII в 53 семьях, в четырех семьях на основе клинического фенотипа [10]. Так как у всех пробандов из одной семьи одинаковый генотип по мутации, то в семьях, где было два или более больных, поиск мутации велся только у одного. У всех пациентов генотипирована только одна мутация в кодирующей последовательности гена *F8*.

3.1.1 Исследование инверсий интрона 22 и интрона 1

Тяжелая форма заболевания обнаружена в 41 случае из 57 обследованных семей. Инверсия интрона 22 является результатом интранемного, межхромосомного или межхроматидного, кроссинговера между последовательностью *int22h* и двумя ее экстрагенными копиями (Рис. 3.1).

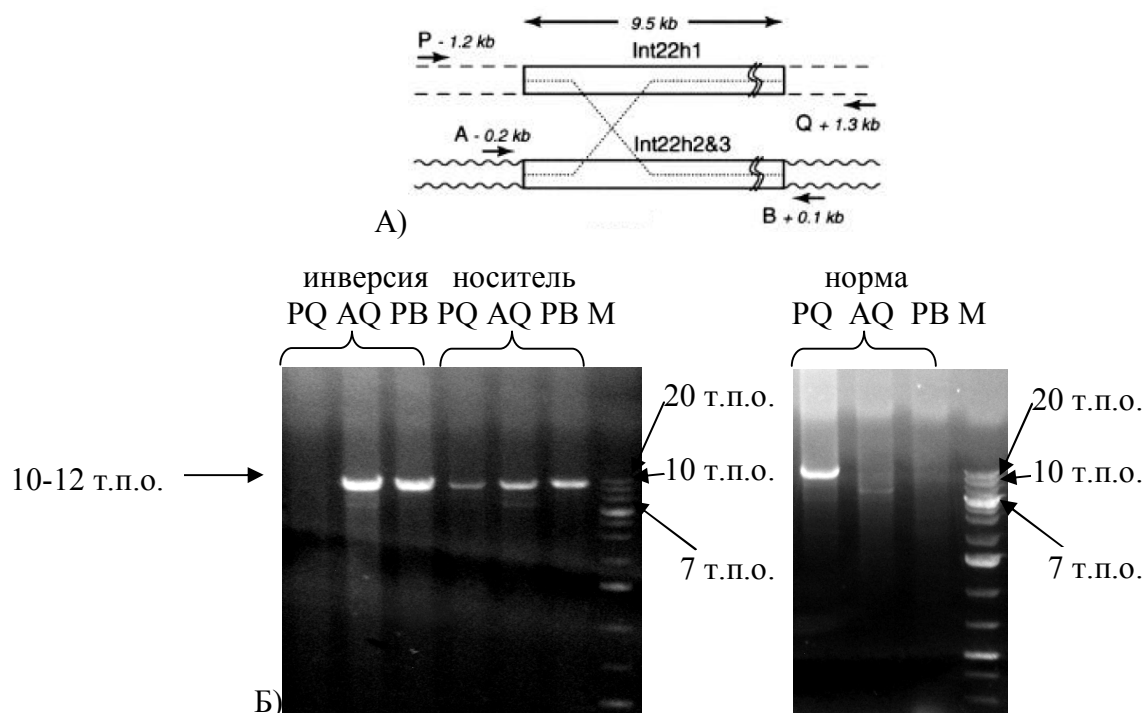


Рис. 3.1. Идентификация инверсии интрона 22 гена *F8*.

А) Верхний прямоугольник представляет нормальную последовательность *int22h-1*, нижний прямоугольник – последовательности *int22h-2* и *int22h-3*, пунктиром обозначается возможная рекомбинация между последовательностями. P, Q, A и B – праймеры, используемые для ПЦР [6].

Б) Агарозный гель-электрофорез (1%) фрагментов ПЦР при исследовании инверсии интрона 22. М – молекулярный маркер 1 Kb Plus (Fermentas Ltd).

При исследовании ДНК 41 пациента с тяжелой формой гемофилии А, инверсия интрона 22 была обнаружена у 16 (39%), что определяет высокую степень информативности данной мутации для диагностики заболевания. Еще одна мажорная мутация при тяжелой форме гемофилии А, инверсия интрона 1, была выявлена в одном случае, что составило 2,4%.

3.1.2 Генетический анализ неинверсионных мутаций

Для обнаружения мутаций у оставшихся 24 пациентов с тяжелой формой и 16 пациентов со среднетяжелой/легкой формами гемофилии А использовался гетеродуплексный анализ.

Таблица 3.1. Мутации гена *F8*, за исключением миссенс-мутаций, выявленные у больных с гемофилией А в Республике Молдова.

Семья	Экзон или интрон	Нуклеотидная замена [‡]	Мутация [§]	FVIII:C (%)	FVIII домен	Происхождение
<i>Инверсии</i>						
01-16	интрон 22			<1		3Ф,10С
17	интрон 1			<1		С
<i>Частичные делеции гена F8</i>						
18	экзоны 15-18	c.5220-?_c.5998+?del		<1	A3	С
19	экзон 26	c.6901-?_c.7056+?del		<1	C2	Ф
<i>Нонсенс-мутации</i>						
20	экзон 14	c.3963C>T*	p.Gln ¹³⁰³ X	<1	B	С
21	экзон 14	c.4345C>T*	p.Glu ¹⁴³⁰ X	<1	B	С
22	экзон 17	c.5773C>T*	p.Gln ¹⁹⁰⁶ X	<1	A3	С
<i>Мутации со сдвигом рамки считывания</i>						
23	экзон 4	c.444delC*	p.Pro130LeufsX11	<1	A1	С
24	экзон 14	c.2935delT*	p.Trp960GlyfsX25	<1	B	С
25	экзон 14	c.3637delA	p.Ile1194PhefsX5	5	B	С
26,27	экзон 14	c.4379_4380insA	p.Asn1441LysfsX1	<1,<1	B	Ф, С
28	экзон 16	c.5428delT*	p.Ser1791LeufsX60	1	A3	Ф
<i>Мутации акцепторного сайта сплайсинга</i>						
29	интрон 4	c.602-2A>G		<1	A1	Ф
30	интрон 4	c.602-5T>C*		2	A1	Ф
31	интрон 22	c.6430-2A>G*		<1	C1	Ф

[‡]Мутации описаны согласно рекомендациям HGVS (Human Genom Variation Society), референсная последовательность NM_000132.3. § Нумерация аминокислот дана согласно номенклатуре HAMSTeRS, * новая мутация, не описанная в HAMSTeRS, Ф – семейный случай гемофилии, С – спорадический, X – стоп кодон.

У тридцати пациентов обнаружилось изменение миграционной подвижности ДНК определенного экзона гена *F8*. У одного пациента была обнаружена делеция экзонов 15-

18 и еще у одного выявлена делеция экзона 26. У восьми пациентов (три с тяжелой формой, 2 со среднетяжелой и 3 с легкой) мутаций обнаружено не было.

Всего в 49 семьях было выявлено 29 уникальных мутаций (Таб.3.1, 3.2), включающих, кроме двух инверсий и двух крупных делеций, 4 небольшие делеции, 1 инсерцию, 3 мутации сайтов сплайсинга, 3 нонсенс- и 13 миссенс-мутаций, еще одна мутация обнаружена в ходе гетеродуплексного анализа, но ее определение требует дальнейшего секвенирования. Пятнадцать из генотипированных мутаций не были ранее обнаружены в других исследованных популяциях [11, 12].

3.1.2.1 Мутации сайтов сплайсинга

Мутации акцепторных сайтов сплайсинга были обнаружены в 2-х семьях с тяжелой и в одной со среднетяжелой формой гемофилии А.

Ранее описанная замена аденинового нуклеотида на гуаниновый, расположенного в позиции с.602-2A>G (-2 п.о. IVS4 A>G) перед экзоном 5, привела к изменению сайта сплайсинга (Рис.3.2, А). Так как последовательность экзона 5 находится в рамке считывания, может иметь место явление «пропускание экзона» (exon skipping), что функционально равносильно частичной делеции гена [13].

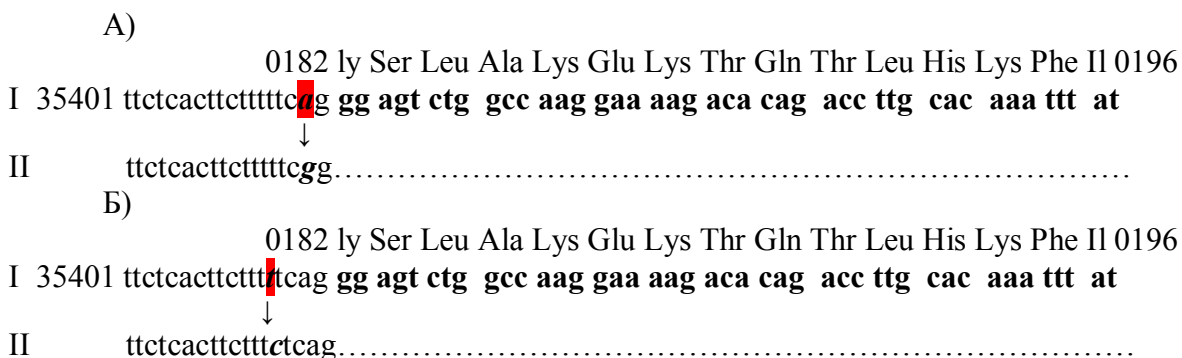


Рис.3.2. Нуклеотидные замены, нарушающие акцепторный сайт сплайсинга в интроне 4 гена *F8*.

А) мутация с.602-2A>G, Б) мутация с.602-5T>C. I ряд – нормальная последовательность интрон 4 - экзон 5 гена *F8* (NG_005114.1), жирными буквами выделена последовательность экзона 5. II ряд – измененная последовательность, жирным курсивом выделен мутировавший нуклеотид.

Нуклеотидная замена с.602-5T>C была идентифицирована у пациента с семейным случаем гемофилии А (Рис. 3.4, Б). Другой мутации в кодирующей последовательности гена *F8* обнаружено не было. При помощи программы «SplicePort» мы проанализировали интронную замену с.602-5T>C и определили, что данная транзигия значительно снижает пороговое значение акцепторного сайта сплайсинга при чувствительности 88,5% с 0,93, характерного для нормальной последовательности, до 0,34.

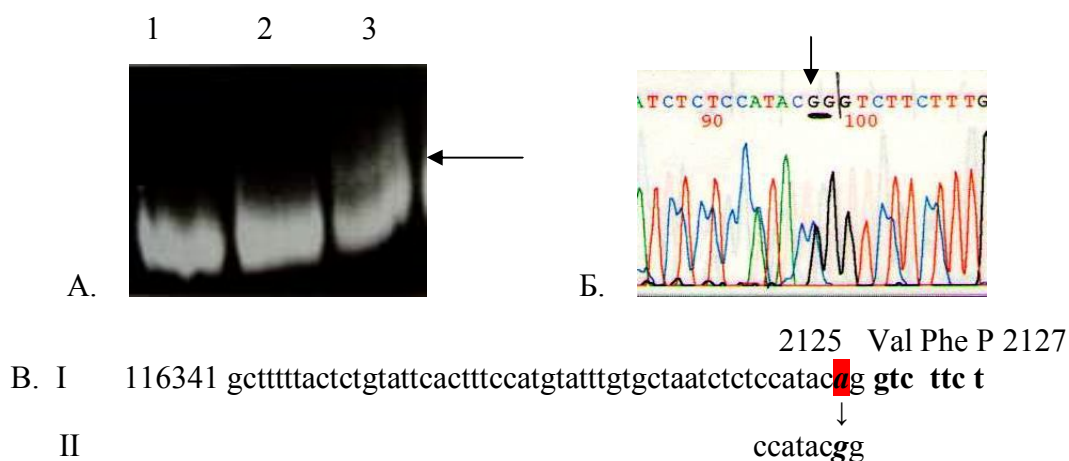


Рис.3.3. Нуклеотидная замена в позиции с.6430-2А>G, нарушающая акцепторный сайт сплайсинга в гене *F8*.

А) Результаты гетеродуплексного анализа экзона 23 (дорожка 1 – контрольная нормальная ДНК, дорожки 2,3 – ДНК пациентов); дорожки 1, 2 показывают нормальную подвижность, дорожка 3 – со сдвигом подвижности. Б) Результаты секвенирования экзона 23 у пациента. В) I ряд – нормальная последовательность интрон 22 - экзон 23 гена *F8*, жирными буквами выделена последовательность экзона. II ряд – измененная последовательность, жирным курсивом выделен мутировавший нуклеотид.

Третья мутация акцепторного сайта сплайсинга также была обнаружена у пациента с семейным случаем гемофилии А и представляла собой замену с.6430-2А>G (Рис. 3.3). Данная мутация не описана в HAMSTeRS.

3.1.2.2 Мутации со сдвигом рамки считывания

Мутации со сдвигом рамки считывания были обнаружены в 6 семьях – это 4 делеции одного нуклеотида и повторяющаяся инсерция одного нуклеотида.

Последовательности адениновых оснований часто становятся сайтами мутаций со сдвигом рамки считывания. Ранее описанная делеция одного аденинового нуклеотида p.Ile1194PhefsX5 в последовательности из 9 А, была обнаружена у пациента со среднетяжелой формой заболевания. Данная мутация ассоциируется как с тяжелым, так и среднетяжелым фенотипом.

Инсерция аденинового нуклеотида p.Asn1441LysfsX1 в последовательности из 9 А была обнаружена в двух неродственных семьях с тяжелой гемофилией А, кроме того в одной из семей заболевание представляло спорадический случай.

Три ранее не описанные делеции p.Pro130LeufsX11, p.Trp960GlyfsX25 и p.Ser1791LeufsX60, приводящие к изменению открытой рамки считывания и преждевременному образованию стоп-кодона, ассоциировались с тяжелым клиническим фенотипом.

3.1.2.3 Нонсенс-мутации

Среди исследованных семей с гемофилией А в трех были идентифицированы нонсенс-мутации. Все три являются новыми нуклеотидными заменами, не опубликованными в базе данных HAMSTeRS. Нонсенс-мутации обнаружены в семьях с тяжелой формой заболевания, что соответствует полному отсутствию функционального белка фактора VIII.

Мутация с.3963C>T приводит к изменению глутаминового кодона CAG на стоп-кодон TAG в положении 1303, в результате чего синтезируется неполноценный белковый продукт, который впоследствии элиминируется. Вторая нонсенс-мутация с.4345C>T также была обнаружена в экзоне 14 гена *F8*, кодирующем В домен. В экзоне 17 была обнаружена замена C>T в позиции с.5773, приводящая к возникновению терминального кодона TAG.

3.1.2.4 Миссенс-мутации

В оставшихся 17 семьях мы определили тринадцать миссенс-мутаций, расположенных в глобулярных доменах A1, A2, A3 и C1 активированного кофактора VIIIa. Семь аминокислотных замен ранее не были обнаружены в других изученных популяциях – G244R, G455W, D459Y, N612D, N1805I, Y1837C и A2061T (Таб.3.2). Мутации P1854L, A2061T и R2163H выявлены более чем в одной семье.

Мутация p.Gly244Arg вызвана заменой гуанина на цитозин в последнем нуклеотиде экзона 6. Глицин в положении 244 является поверхностно экспонированной аминокислотой и не участвует в междоменных взаимодействиях (Рис.3.4, А). Замена G на C нарушает каноническую последовательность донорного сайта сплайсинга, что является наиболее вероятной причиной возникновения тяжелой формы гемофилии А.

Мутация p.Thr275Ile была обнаружена у пациента, активность фактора VIII которого составляла 3,8%. Треонин в положении 275 вместе с аминокислотными остатками 271-287 образует нерегулярную петлю в структуре домена A1, которая взаимодействует с петлей домена A2 из остатков 517-524. Замена треонина на изолейцин может нарушать взаимодействие между этими доменами. В связи с тем, что активированный фактор VIIIa инактивируется при диссоциации домена A2 [14], мутация p.Thr275Ile должна приводить к уменьшению периода полужизни белка.

Аминокислотная замена p.Arg372Cys была обнаружена у пациента, уровень фактора VIII которого составлял 3%. Расщепление тяжелой цепи фактора VIII в позиции аргинин 372 – серин 373 необходимо для экспонирования сайта, взаимодействующего с фактором IXa.

Таблица 3.2. Миссенс-мутации гена *F8*, выявленные у больных с гемофилией А в РМ.

Семья	Экзон или интрон	Нуклеотидная замена [‡]	Мутация [§]	Фенотип	FVIII:C (%)	FVIII домен	Происхождение
32	экзон 6	c.787G>C*	p.Gly244Arg	тяжелый	<1	A1	С
33	экзон 7	c.881C>T	p.Thr275Ile	средней тяжести	4	A1	С
34	экзон 8	c.1171C>T	p.Arg372Cys	средней тяжести	3	A1	Ф
35	экзон 9	c.1331A>G	p.Lys425Arg	тяжелый		A2	С
36	экзон 9	c.1420G>T*	p.Gly455Trp	тяжелый	<1	A2	С
37	экзон 9	c.1432G>T*	p.Asp459Tyr	тяжелый	<1	A2	С
38	экзон 12	c.1891A>G*	p.Asn612Asp	тяжелый	<1	A2	С
39	экзон 16	c.5471A>T*	p.Asn1805Ile	тяжелый	1	A3	Ф
40	экзон 16	c.5567A>G*	p.Tyr1837Cys	тяжелый	<1	A3	Ф
41-43	экзон 17	c.5618C>T	p.Pro1854Leu	средней тяжести	2-4	A3	2Ф,1С
44,45	экзон 21	c.6238G>A*	p.Ala2061Thr	средней тяжести	5, 5	C1	Ф,С
46	экзон 22	c.6319G>A	p.Gly2088Ser	средней тяжести	2	C1	С
47,48	экзон 23	c.6545G>A	p.Arg2163His	тяжелый	<1,1	C1	2С
49 [‡]	экзон 11			средней тяжести	1,5	A2	С

[‡]Мутации описаны согласно рекомендациям HGVS, референсная последовательность NM_000132.3. § Нумерация аминокислот дана согласно номенклатуре HAMSTeRS, * новая мутация, не описанная в HAMSTeRS, [‡] мутация выявлена, но не идентифицирована. Ф – семейный случай гемофилии, С – спорадический.

Лизин в позиции 425 расположен глубоко во внутренней структуре фактора VIII и его аминокислоты формируют солевой мостик с карбоксильной группой глутаминовой кислоты в позиции 581. Замена лизина на более массивный аргинин сохраняет положительный заряд, но нарушает упаковку внутренней структуры так же, как и конформационную структуру спираль-изгиб-спираль (Рис. 3.4, Б). Мутация была обнаружена у пациента с тяжелой формой гемофилии.

Миссенс-мутация p.Gly455Trp выявлена у пациента с тяжелой формой гемофилии. Глицин 455 является одной из аминокислот β -стрэнда, включающего остатки 453-456. Замена на массивный триптофан вероятнее всего будет разрывать эту структуру домена A2 или оказывать влияние на петлю из аминокислотных остатков 558-565, мутации в которых приводят к изменению взаимодействия домена A2 с активированным фактором IXa, что в конечном счете снижает каталитическую активность X-азного комплекса.

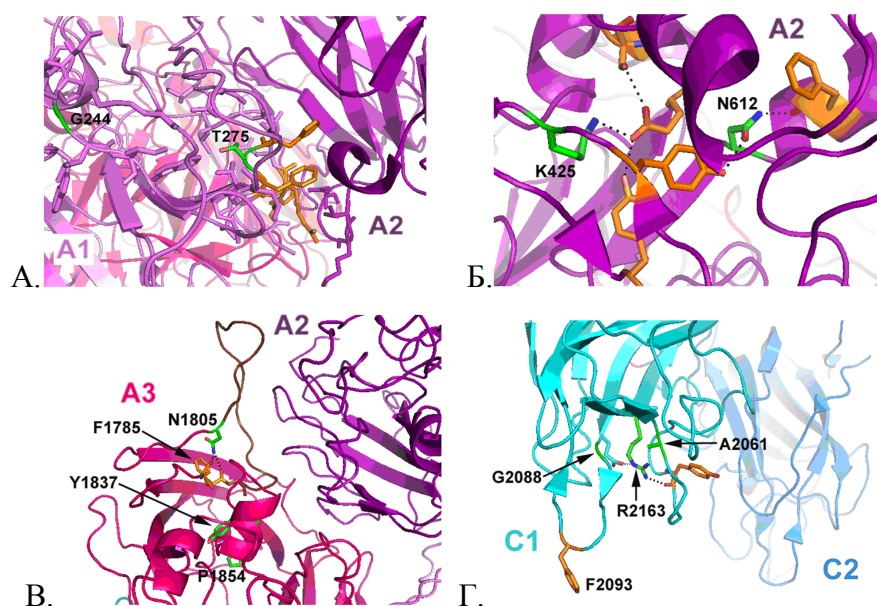


Рис. 3.4. Кристаллическая структура фактора VIII в некоторых сайтах миссенс-мутаций [14].

Показаны положения аминокислотных остатков и междоменные взаимодействия, пунктиром обозначены водородные связи.

Домен A1 влияет на правильную ориентацию домена A2 по отношению к другим доменам активированного фактора VIIIa, таким образом способствуя взаимодействию с активным сайтом фактора IXa. Новая замена аспарагиновой кислоты 459 на более крупный тирозин, вероятно, нарушает взаимодействие с триптофаном 382, который входит во фрагмент из остатков 373-385, взаимодействующий с димером A1/A3-C1-C2 [15]. В конечном итоге мутация приводит к изменению каталитической активности X-азного комплекса, что объясняет развитие тяжелого клинического фенотипа у пациента с данной мутацией.

Последней миссенс-мутацией, обнаруженной в домене A2, была замена p.Asn612Asp. Аспарагин 612 образует водородную связь с тирозином 423 во внутренней структуре домена A2 (Рис. 3.4, Б). Замена незаряженного аспарагина на остаток аспарагиновой кислоты связана с изменением заряда в этом сайте, что нарушает конформацию соседних участков белка.

Две новые миссенс-мутации были обнаружены в домене A3 – это p.Asn1805Ile и p.Tyr1837Cys, и одна ранее описанная – p.Pro1854Leu (Рис. 3.4, В). Аспарагин 1805 образует водородную связь с серином 1784, между этими двумя остатками располагается петля, участвующая во взаимодействии доменов A2-A3. Аминокислотная замена может изменять взаимодействие между двумя A доменами, дестабилизируя конформационную

структуру окружающих остатков, и оказывать влияние на взаимодействие с активированным фактором IXa. Мутация была обнаружена у пациента с тяжелой формой заболевания. Тирозин в положении 1837 располагается глубоко во внутренней структуре домена A3. Замена на цистеин будет дестабилизировать и нарушать структуру близлежащих аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействиях, обеспечивающих каталитическую функцию фактора VIII.

Мутация p.Pro1854Leu была обнаружена нами в 3 неродственных семьях с гемофилией A. У пациентов с данной мутацией в нашем исследовании уровень фактора варьировал от 2 до 5%. В двух семьях заболевание представляло семейный случай, исследование родословной в трех поколениях не выявило между ними родства. Однако, при изучении полиморфизмов гена *F8* у этих пациентов был обнаружен одинаковый гаплотип – HindIII (+)/AluI(-)/I7Pg/a(-), и обе семьи проживали в одном регионе РМ. Это дает возможность предположить «эффект основателя» в появлении мутации p.Pro1854Leu. В третьей семье гемофилия представляла спорадический случай, и гаплотип пациента отличался от двух других.

Новая мутация p.Ala2061Thr была обнаружена в двух неродственных семьях со среднетяжелой формой заболевания (FVIII:C 4-5%). Аланин 2061 располагается глубоко во внутренней структуре домена C1 (Рис. 3.4, Г), замена на треонин приводит к изменению гидрофобности и дестабилизирует цепь. У пациентов был обнаружен одинаковый гаплотип HindIII (-)/AluI(+)/I7Pg/a(+).

Ранее описанная в HAMSTeRS мутация p.Gly2088Ser, как и в нашем исследовании, была обнаружена у пациента со среднетяжелой формой гемофилии A. Глицин 2088 и фенилаланин 2096 вместе с другими, расположенными между ними, аминокислотными остатками образуют петлю, располагающуюся на поверхности домена C1. Сравнение аминокислот этой петли и структуры «шпильки» мембрансвязывающего сайта в гомологичном домене C2 фактора VIII позволяет предположить, что этот участок может участвовать в связывании с липидами или тромбоцитами. Аргинин 2163 также участвует в поддержании структуры петли (Рис.3.4, Г). Так как рекомбинантный белок, состоящий из доменов C1C2, фактора VIII обладает повышенным аффинитетом к активированным тромбоцитам по сравнению с доменом C2 [16], то, вполне вероятно, что этот участок ответственен за взаимодействие активированного фактора VIIIA с мембранами.

Аминокислотная замена p.Arg2163His была обнаружена в двух неродственных семьях со спорадическими случаями тяжелой формы гемофилии A. Однако, подобно случаям с мутациями p.Pro1854Leu и p.Ala2061Thr, у пациентов был обнаружен

одинаковый гаплотип HindIII (-)/AluI(-)/I7Pg/a(+), что также позволяет предположить наличие «эффекта основателя».

На основе современных представлений о строении гена и белка фактора VIII мы охарактеризовали мутации, обнаруженные у пациентов с гемофилией А. Анализ новых мутаций дает дополнительную информацию о молекулярной природе гемофилии А, объясняя эффект генетических изменений в процессе экспрессии гена и функциональных взаимодействий фактора VIII.

3.1.3 Частота мутаций при гемофилии А и их распределение в гене F8

Анализ мутаций у пациентов с гемофилией А в Республике Молдова показал (Рис. 3.5), что их распределение было аналогично распределению, ранее выявленному в популяциях Германии, Италии, Аргентины и Индии [17-20].

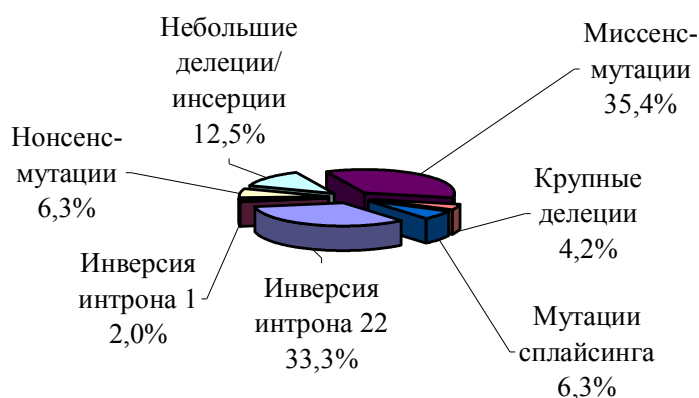


Рис. 3.5. Мутационный профиль у пациентов с гемофилией А в РМ.

Мутации были обнаружены в 49 (86%) семьях из 57 обследованных, в 32% случаев это были новые мутации. Тип мутаций соответствовал молекулярному дефекту [21]. В 8 семьях, где не удалось генотипировать мутации, генетический дефект может находиться в интронах, которые не исследуются при обычном скрининге мутаций.

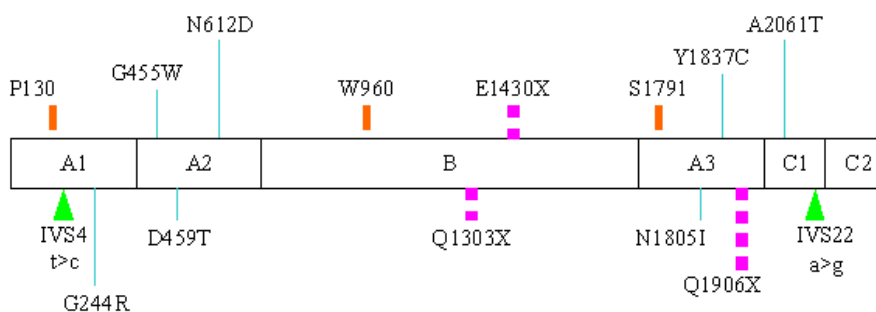


Рисунок 3.6. Новые мутации гена фактора VIII.

Тонкими бирюзовыми линиями отмечены миссенс-мутации, розовым пунктиром – нонсенс-мутации, толстыми оранжевыми линиями – мутации со сдвигом рамки считывания, салатовые треугольники – мутации сплайсинга.

Точечные мутации выявлены в 10 экзонах и 3 интронах гена фактора VIII. Расположение новых мутаций, обнаруженных у пациентов с гемофилией А, представлено на рисунке 3.6. Наши данные еще раз подтверждают высокий уровень гетерогенности мутаций гена фактора VIII.

3.2 Исследование полиморфизмов гена *F8* в выборке здорового населения РМ

В связи с тем, что в нашем исследовании в 14 % семей не было обнаружено мутаций в кодирующей области гена *F8*, альтернативой в таких случаях является проведение косвенного исследования. Чтобы определить целесообразность применения некоторых полиморфизмов гена *F8* для диагностики гемофилии А, нами был проведен молекулярно-генетический анализ информативности 4 внутригенных полиморфных маркеров в выборке здорового населения РМ – это биаллельные варианты *HindIII*, *AluI* и транзигция G/A в интроне 7 (I7P) (Таб. 3.3), и мультиаллельные (CA)_n повторы в интроне 13.

Таблица 3.3. Исследование полиморфизмов гена *F8* в выборке здорового населения РМ.

Полиморфизм	Уровень теоретической гетерозиготности	Уровень фактической гетерозиготности	Значения χ^2
<i>HindIII</i> интрон 19	0,385	0,365	0,2; 0,75>P >0,5
<i>AluI</i> интрон 1	0,498	0,55	0,81; 0,5>P >0,25
G/A полиморфизм в интроне 7	0,365	0,417	0,23; 0,75>P >0,5
(CA) _n повторы интрон 13	0,64	0,50	3,83; 0,1>P>0,05

Как видно из таблицы, высокая гетерозиготность характерна для (CA)_n повторов, и достаточно высоким уровнем гетерозиготности обладают все три биаллельных полиморфизма. Статистических различий между уровнями теоретической и наблюдаемой гетерозиготности выявлено не было. Однако наличие аллельных ассоциаций между ПДРФ сайтами может значительно снижать их суммарную информативность. Поэтому мы провели исследование аллельных ассоциаций для определения величины неравновесия по сцеплению (Таб. 3.4).

Таблица 3.4. Аллельные ассоциации между полиморфными локусами гена *F8*.

Ассоциация	Число хромосом	χ^2	D	r	P
<i>HindIII</i> / <i>AluI</i>	92	11,08	0,076	0,347	<0,01
I7P/ <i>HindIII</i>	111	19,74	0,079	0,422	<0,01
I7P/ <i>AluI</i>	60	6,29	0,069	0,324	<0,01

Для полиморфизмов *HindIII*/I7P обнаружено достаточно жесткое неравновесие по сцеплению об этом говорят высокие показатели χ^2 , и коэффициентов корреляции (r) и

неравновесного сцепления (D). Достаточно сильное, но не полное неравновесие было определено и для 2-х других комбинаций. При совместном исследовании трех биаллельных полиморфизмов у 48 женщин эффективность выявления гетерозигот составила 66%, т.е. незначительно повысилась за счет добавления полиморфизма G/A в интроне 7. Таким образом, использовать этот полиморфизм стоит только в редких случаях, когда локусы HindIII и AluI не информативны.

При исследовании микросателлитных (CA)_n повторов в интроне 13 в молдавской выборке были обнаружены 6 полиморфных аллелей с количеством повторов от 19 до 24, аллели с количеством повторов 16-18 обнаружены не были. Три аллеля (CA)_n повторов представлены на рисунке 3.7. Наиболее частыми оказались аллели (CA)₂₀ и (CA)₂₁ с встречаемостью 0,54 и 0,22, соответственно. Аллель с количеством повторов (CA)₂₄ выявлен как наиболее редкий.

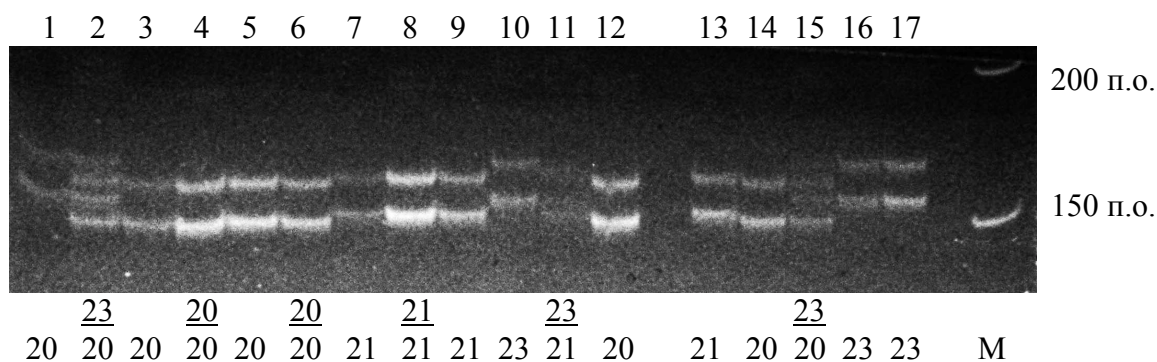


Рис. 3.7. Электрофореграмма ДНК анализа микросателлитных (CA)_n аллелей гена F8, 8% ПААГ(19:1).

Треки 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 16 – образцы мужской ДНК; 2, 4, 6, 8, 11, 14, 15, 17 – образцы женской ДНК; М – маркер молекулярной длины (50 bp DNA ladder, Fermentas Ltd).

Как видно из таблицы 3.5, наиболее частые аллели, выявленные в молдавской выборке, так же преобладают среди других изученных популяций индоевропейской группы. Значительно отличается в этом плане китайская популяция, в которой преобладают аллели с количеством повторов 25 и 26.

Уровень наблюдаемой гетерозиготности 0,50 статистически не отличался от уровня теоретической 0,64, рассчитанной по закону Харди-Вайнберга ($\chi^2=3,83$; $0,1>P>0,05$). Коэффициент отклонения фактической гетерозиготности от теоретической составил 0,21. Совместное исследование (CA)_n повторов с 3-мя биаллельными полиморфизмами у 48 женщин привело к увеличению выявления гетерозигот на 13,2% и суммарно составило 79,2%.

Таким образом, исследования по распределению частот 4-х полиморфизмов позволили выявить 3 высокоинформативных – это HindIII/интрон 19, AluI/интрон 1 и

(CA)_n повторы в интроне 13. Полученные данные позволяют использовать эти локусы в качестве генетических маркеров при гемофилии А для диагностических целей, включая выявление гетерозиготных носительниц патологических генов и пренатальную диагностику.

Таблица 3.5. Аллельные частоты (CA)_n повторов в интроне 13 гена *F8* в различных популяциях [22-24].

Количество СА повторов	Европа %	Китай %	Россия %	Индия %	Иран %	Турция %	Молдова %
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	-	-	-	-	-
ТГ	69	68	63	57	64	62	63,9
НГ	91	53,7	34	56	52	50	50

ТГ – уровень теоретической гетерозиготности, НГ – уровень наблюдаемой гетерозиготности

3.3 Практическое применение ДНК-анализа в семьях с гемофилией А

Вышеперечисленные полиморфные локусы гена *F8* были использованы для исследования 73 женщин из семей с гемофилией А [25-28]. Совместный анализ мутаций и полиморфизмов в нашем исследовании позволил выявить мутацию или генетический маркер для 92% семей (56/61).

На рисунке 3.8 представлен разработанный алгоритм исследования семей с гемофилией А. Предложенная диагностическая схема, позволила выявить 85,7% мутаций в гене фактора VIII у больных с диагнозом гемофилия А.

С помощью разработанного алгоритма было проведено определение статуса носительства у женщин высокого риска из семей с гемофилией А. Из 23 матерей пациентов со спорадической гемофилией А, принявших участие в исследовании, 22 были диагностированы как носительницы. Из 24 родственниц пациентов по материнской линии, статус носительницы был установлен у 13. В 2-х случаях статус носительницы был определен в результате исследования полиморфных сайтов.

Пренатальная диагностика сочетала исследование ранее обнаруженных мутаций в семье и/или анализ полиморфизмов гена *F8*. Было проведено 5 пренатальных диагностик – 2 плода женского пола и 3 мужского, в 2 случаях плод мужского пола был болен.

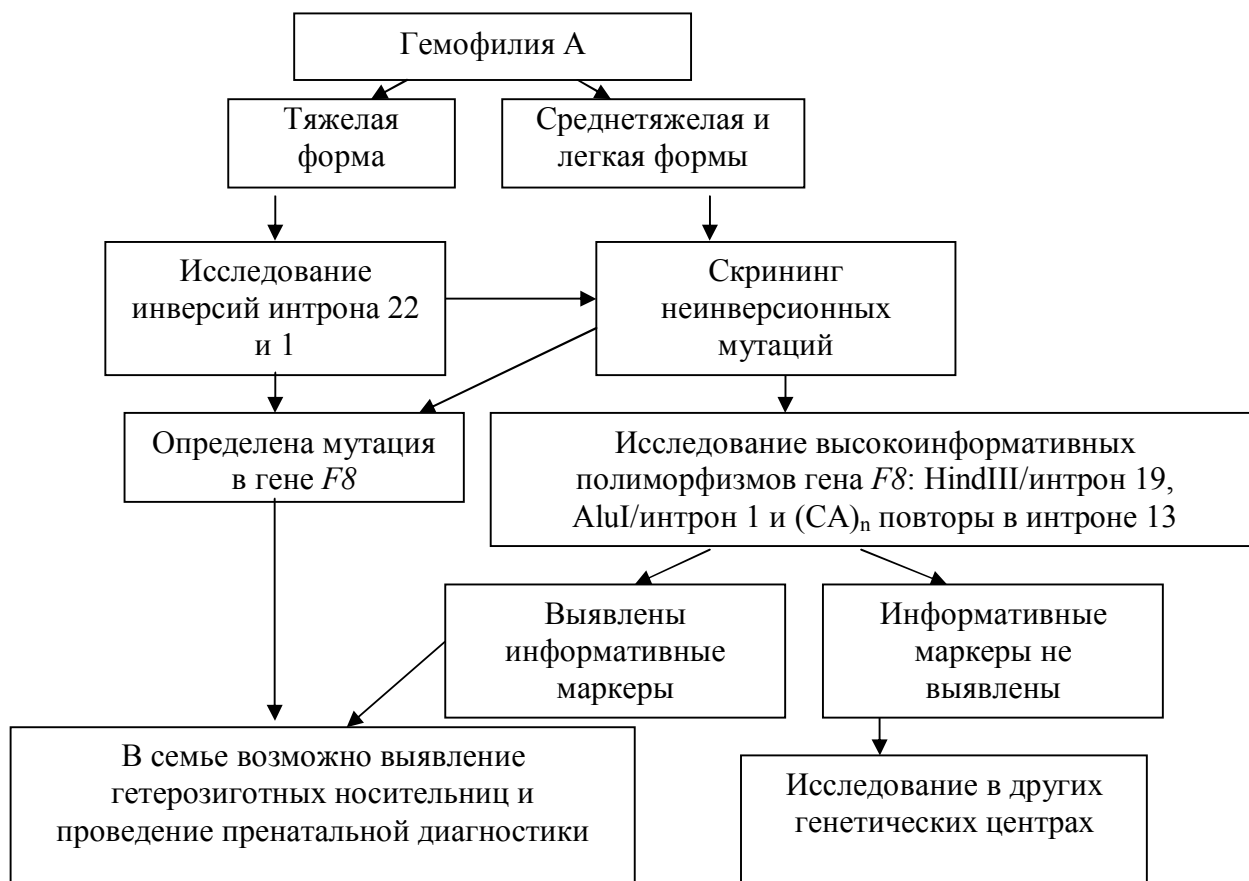


Рис.3.8. Алгоритм молекулярно-генетического исследования семей с гемофилией А.

В нашем исследовании была выявлена группа пациентов с повышенным риском развития ингибиторов в случае лечения их концентратами фактора VIII, которая определялась типом мутации и ее расположением. В нее вошли двадцать два больных: семнадцать с инверсиями, два с крупными делециями и три с нонсенс-мутациями.

4. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *F9* У БОЛЬНЫХ С ГЕМОФИЛИЕЙ В И В ВЫБОРКЕ ЗДОРОВОГО НАСЕЛЕНИЯ РМ

4.1 Молекулярно-генетическое исследование гена *F9* у пациентов с гемофилией В

Для идентификации мутаций нами проведено исследование образцов ДНК 9 пациентов из 5 семей с гемофилией В. Мутации выявлены в ходе секвенирования кодирующей последовательности гена *F9*, включая промоторную область, 5'-область,

сайты сплайсинга и область 3'. У всех пациентов была диагностирована тяжелая форма заболевания с уровнем фактора IX менее 1%.

Таблица 4.1. Мутации гена *F9*.

№	Экзон/ интрон	Тип мутации	Нуклеотидная замена	Мутация [§]	Насле- дование
1	i7	ASJ	c.867-4A>G (A→G ³⁰⁸¹⁸)		Ф
2	i1	ASJ	c.118-2A>C* (A→C ⁶³²⁴)		Ф
3	i5	ASJ	c.550-1G>A* (G→A ²⁰³⁶²)		С
4	e8-3'	М	c.1266G>A (G→A ³¹²²⁰)	p.Gly367Arg	Ф
5	e8-3'	Fs	c.1401delA (ΔA ³¹³⁵⁵)	p.Thr412GlnfsX25	Ф

ASJ – мутация акцепторного сайта сплайсинга, М – миссенс-мутация, Fs – мутация со сдвигом рамки считывания, * новая мутация. В скобках указана нумерация нуклеотидов согласно Yoshitake et al. [6], § нумерация аминокислот дана согласно номенклатуре, используемой в базе данных по гемофилии В. Ф – семейный случай гемофилии, С – спорадический.

Обнаружены 3 мутации акцепторного сайта сплайсинга, одна миссенс-мутация и одна мутация со сдвигом рамки считывания, в том числе две новых, ранее не охарактеризованных в базе данных по гемофилии В. У каждого пациента была идентифицирована только одна мутация (Таб. 4.1).

4.2 Полиморфизмы гена *F9* в выборке здорового населения РМ

Для определения целесообразности применения 5-ти полиморфизмов гена *F9* для диагностики гемофилии В в выборке здорового населения РМ был проведен молекулярно-генетический анализ информативности этих маркеров (Таб.4.2).

Таблица 4.2. Исследование полиморфных локусов гена *F9* в выборке здорового населения РМ.

Полиморфизм	Уровень теоретической гетерозиготности	Уровень фактической гетерозиготности	Значения χ^2
DdeI интрон 1	0,449	0,647	3,0; 0,1>P >0,05
MseI 5'область	0,427	0,533	1,71; 0,25>P >0,1
HhaI 3'область	0,461	0,50	0,17; 0,75>P >0,5
MnII экзон 6	0,449	0,421	0,21; 0,75>P >0,5
TaqI интрон 4	0,394	0,435	0,17; 0,75>P >0,5

Совместное исследование локусов DdeI, MseI, HhaI, MnII и TaqI позволило выявить гетерозиготный генетический маркер для 16 из 17 обследованных женщин, т.е. косвенная диагностика гемофилии В будет эффективна более чем в 94% случаев. Нами были рассчитаны величины аллельных ассоциаций для всех возможных комбинаций генетических маркеров (Таб.4.3), которые могут снижать суммарную информативность. Как видно из таблицы, незначительные ассоциации выявлены для сайтов MseI/MnII и

MseI/TaqI, кроме того выявлено сильное, но не полное сцепление между сайтами MnlI/TaqI. Исходя из этих данных, а также уровнем теоретической и наблюдаемой гетерозиготности полиморфных локусов в молдавской выборке, наиболее целесообразным для косвенной диагностики гемофилии В является использование комбинации полиморфизмов DdeI, MseI и HhaI для поиска генетического маркера. В случае, если эти полиморфизмы окажутся не информативны, они могут быть дополнены исследованием сайтов TaqI и MnlI.

Таблица 4.3. Аллельные ассоциации между полиморфизмами гена *F9*.

Ассоциация	Число хромосом	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 Практическое применение ДНК-анализа в семьях с гемофилией В

Генотипирование в семьях с гемофилией В позволило выявить мутации, являющиеся причиной заболевания, во всех 5 исследованных семьях. Также в этих семьях было проведено исследование полиморфизмов, позволившее определить, по крайней мере, один информативный генетический маркер для каждой семьи [29, 30]. Пренатальная диагностика гемофилии В проводилась дважды. Плод женского пола не являлся носителем гемофилии В, плод мужского пола был болен.

В ходе анализа полученных данных, генотипирования мутаций и исследования полиморфизмов, был разработан алгоритм обследования семей с гемофилией В (Рис. 4.1). Предложенная схема позволяет выявлять до 100% мутаций в гене фактора IX у больных с диагнозом гемофилия В.

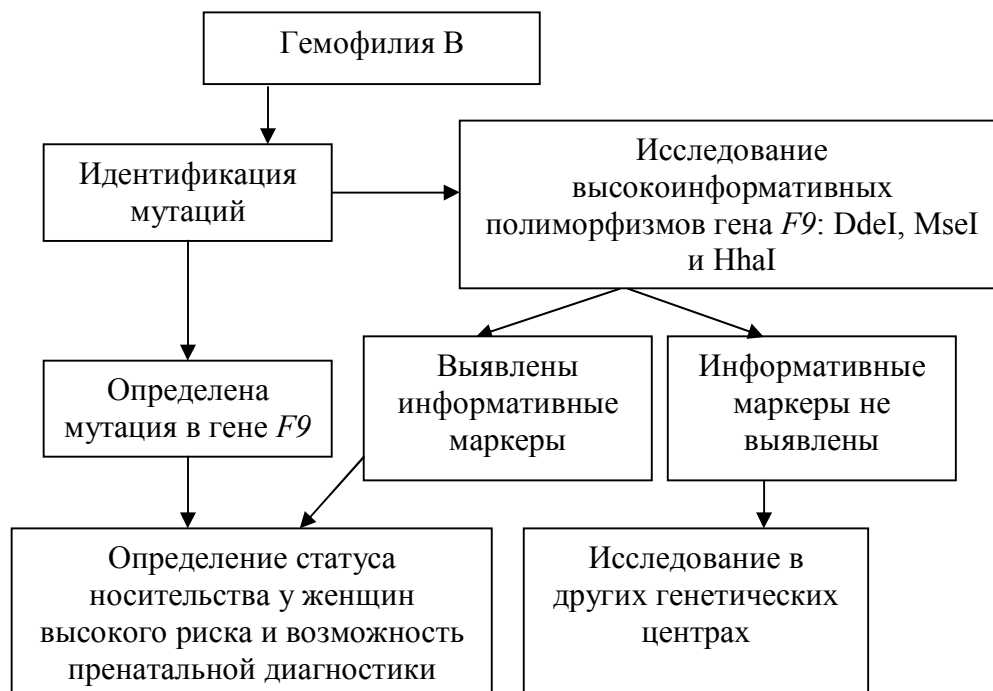


Рис. 4.1. Алгоритм молекулярно-генетического исследования семей с гемофилией В.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В ходе исследования найдены и охарактеризованы 15 новых мутаций гена *F8* и две новые мутации гена *F9*. При помощи биоинформатической обработки и последних данных по структурно-функциональным взаимодействиям фактора VIII дана интерпретация патологических эффектов 7 новых миссенс-мутаций гена *F8*. В ходе анализа новых мутаций получена дополнительная информация о молекулярной природе гемофилии А и В.
2. Выявлена группа, состоящая из двадцати двух пациентов (семнадцать пациентов с инверсиями, два – с крупными делециями и три – с нонсенс-мутациями), для которой существует повышенный риск возникновения аллоиммунных ингибиторов к фактору VIII в случае применения концентратов фактора для лечения гемофилии А.
3. Проведен молекулярный анализ 4-х полиморфных локусов гена *F8* для определения целесообразности их использования в диагностике гемофилии А. Выявлены 3 высокоинформативных полиморфизма: HindIII/интрон 19, AluI/интрон 1 и (CA)_n повторы в интроне 13, для которых суммарный уровень гетерозиготности составляет около 76%.
4. В ходе молекулярного анализа 5-ти полиморфных локусов гена *F9* выявлены 3 высокоинформативных: DdeI, MseI и NhaI, при использовании которых диагностика заболевания и выявление носительниц гемофилии В возможны в 82,3% случаев.

Обнаружено отсутствие предпочтительных ассоциаций для большинства возможных комбинаций полиморфных аллелей.

5. Разработаны диагностические алгоритмы, с помощью которых возможна идентификация около 85% мутаций в гене *F8* и до 100% мутаций в гене *F9* у больных с диагнозом гемофилия А или В, соответственно. Совместное применение прямого и косвенного анализа указанных генов позволяет проводить определение статуса носительства и пренатальную диагностику более чем в 91% семей.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При выявлении пациентов с гемофилией рекомендовано направлять семьи для генетической диагностики. Обследовать матерей и женщин высокого риска для выявления мутации или информативного генетического маркера для использования полученных данных при проведении пренатальной диагностики в сжатые сроки.
2. Пациентов с гемофилией А с инверсиями, крупными делециями и нонсенс-мутациями в экзонах с 14 по 26 исследовать на наличие ингибиторов к фактору VIII при первых признаках снижения эффективности лечения концентратами фактора.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Kembell-Cook G. The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site. <http://europium.csc.mrc.ac.uk/> (посещался 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> (посещался 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 până 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 până la 85,7% mutații în gena *F8* și până 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 Reproduserii 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 distribution 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 carriers 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.

ШИРОКОВА НАТАЛИЯ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *F8* И *F9* У
ПАЦИЕНТОВ С ГЕМОФИЛИЕЙ А И В
В РЕСПУБЛИКЕ МОЛДОВА**

03.00.15 – GENETICĂ

Подписано в печать: 07.04.2010
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Авторских листов: 1

Формат бумаги 60x84 1/16
Тираж 30 экз.
Заказ №. 22881

Primex Com, ул. Букурешть 59, Кишинев

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

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