

СКРИНИНГ ЗА ИНВЕРСИЯ 22 (Inv22) В ГЕНА ЗА КОАГУЛАЦИОНЕН ФАКТОР VIII ПРИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С ТЕЖКА ФОРМА НА ХЕМОФИЛИЯ А

Венцеслав Атанасов*, Светла Николова, Радослава Въжарова**,
Албена Тодорова***, Алексей Савов*, Иво Кременски***

Национална генетична лаборатория, УСБАЛАГ „Майчин дом”, МУ-София, 1431 София, България, **Лаборатория по медицинска генетика и молекулярна биология, УБ „Лозенец”, СУ „Св. Климент Охридски”, 1407 София, България, *ГМДЛ „Геника”, 1612 София, България; ventseslav.atanasov@gmail.com*

INVERSION 22 SCREENING IN THE COAGULATION FACTOR VIII GENE IN BULGARIAN PATIENTS WITH SEVERE FORM OF HEMOPHILIA A

Ventseslav Atanasov*, Svetla Nikolova, Radoslava Vazharova**,
Albena Todorova***, Alexey Savov*, Ivo Kremensky***

National Genetic Laboratory, University Hospital of Obstetrics and Gynecology “Maichin Dom”, Medical University-Sofia, 1431 Sofia, Bulgaria, **Laboratory of Medical Genetics and Molecular Biology, University Hospital “Lozenetz”, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, 1407 Sofia, Bulgaria, *Genetic Medical Diagnostic Laboratory Genika, 1612 Sofia, Bulgaria; ventseslav.atanasov@gmail.com*

Abstract

Introduction: Haemophilia A is a X-linked recessive disease characterized by qualitative and quantitative factor VIII deficiency resulting from various mutations in the *F8* gene. It is manifested by a disruption of blood clotting ability. In Bulgaria, the incidence of haemophilia A is about 1: 9,000 males. Three clinical forms have been distinguished by the factor VIII levels: severe (<1%), moderate (2-5%) and mild (5-30%). Intron 22 inversions (Inv22) in the *F8* gene account for 42-50% of all cases of severe haemophilia A.

Materials and Methods: An inverse PCR (I-PCR) was optimized and introduced as a diagnostic method for Inv22 screening, involving 3 steps: 1. BclI restriction; 2. Self-ligation of restriction fragments, providing BclI rings; 3. Multiplex PCR using 3 primer pairs. The visualization of the resulting PCR products was performed on a UV-transilluminator after a standard agarose gel electrophoresis.

Results and Discussion: Altogether, 30 patients with severe haemophilia A and their relatives, including 23 cases (100%) with a confirmed clinical diagnosis of "severe haemophilia A", were studied. In 7 cases (30%), the presence of Inv22 was demonstrated by I-PCR. The lower Inv22 incidence in patients with severe haemophilia A in our study compared to the literature (42-50%) is probably due to the smaller sample.

Conclusions: The Inv22 screening approach used in patients with severe haemophilia A is a sensitive and reproducible diagnostic and research method, a relatively fast technique (as opposed to Southern blot hybridization), a relatively inexpensive and applicable method in the systemic analysis of haemophilia A.

Key words: haemophilia A, severe form, *F8*-gene, Inv22, I-PCR

Въведение: Хемофилия А е X-свързано рецесивно заболяване, което се характеризира с качествен и количествен дефицит на фактор VIII (компонент в коагулационна каскада) в резултат на различни мутации в *F8*-гена и се изразява в нарушаване способността за кръвосъсирване. Заболяването засяга предимно мъже и се предава от жени, които са хетерозиготни носители. Хемофилия А е най – често срещаното заболяване от тези с нарушаване на кръвосъсирването с честота между 1:5 000 и 1:10 000 мъже [3]. Честотата на хемофилия А в България е около 1: 9 000 момчета.

Клинични форми на хемофилия А: Клинична диагноза “хемофилия А” се поставя при наличие на кръвоизливи и концентрация на фактор VIII – под 30% от нормата при пациента. Тежестта и честотата на кръвоизливите при хемофилия А е обратно пропорционална на количеството на фактор VIII. В зависимост от това се разграничават 3 основни клинични форми: тежка (концентрацията на фактор VIII <1%), умерена (2-5%) и лека (5-30%) с честота съответно 50, 10 и 40% респ. [2]. Жените носителки с концентрация на фактор VIII под 35% също са рискови по отношение на кръвотечение.

Основната причина за смъртността, свързана с кървенето при нелекувани индивиди е вътречерепен кръвоизлив. Вследствие на кръвотечението се развива хронично заболяване на ставите. Съвременното лечение на хемофилия А се провежда посредством преливане на концентрат на кръвосъсирващия фактор VIII, приготвен от човешка плазма или създаден посредством рекомбинантни ДНК – технологии за нормализиране на предстоящия живот и намаляване на хроничното заболяване на ставите. В повечето случаи прилагането на подобна терапия предотвратява до голяма степен възникването на сериозни епизоди на кръвотечение, но при около 30% от индивидите с тежка форма на хемофилия А се формират антитела срещу екзогенния фактор VIII, което значително затруднява лечението.

Молекулни основи: Генът, кодиращ фактор VIII в коагулационната каскада е F8. Той съдържа 26 екзона, които кодират полипептидна верига от 2351 аминокиселини [6, 20]. Локализиран е в дисталния край на дългото рамо на X – хромозомата (Xq28), теломерно спрямо гена за фактор IX. F8 – генът е един от най-големите гени в човешкия геном и заема 0,1% от дължината на цялата X – хромозома. Екзоните са с размер 70 bp-3kb. [6, 19, 22]. От интроните най-голям е интрон 22, а от екзоните – екзон 14. Процесираната мРНК е с дължина 9 kb и е била детектирана в различни тъкани – черен дроб, бъбреци и слезка [21]. Белтъчният продукт (фактор на кръвосъсирване VIII) представлява голям плазмен гликопротеин, който се синтезира като прекурсорна молекула (2332 аминокиселинни остатъка и сигнален пептид от 19 аминокиселини) и претърпява различни реакции на модифициране. Зрелият белтък се състои от две вериги – лека и тежка с молекулни маси съотв. 80 и 200 kD [8]. В структурно отношение фактор VIII е образуван от три типа домени – А, В и С и три къси области(ar1 - 3) богати на аминокиселини [20]. В посока от NH₂ – към –COOH края редът на домените е: A1-ar1-A2-ar2-B-ar3-A3-C1-C2 [8]. Фактор VIII се синтезира основно в черния дроб и циркулира като неактивен кофактор на кръвосъсирване с концентрация в кръвната плазма малко под 1 pmol/L и се активира от следови количества на тромбин, образуван началото на коагулационния процес [21].

Генотип – фенотип корелации: Поради значителната големина на F8 – гена (186 kb) и големия брой функционално важни участъци, множество молекулни дефекти могат да доведат до хемофилия А. Мутациите предизвикват нарушения в нивото на транскрипция или транслация или водят до промени на индивидуални аминокиселини във фактор VIII – белтъка. До този момент са описани 2015 уникални варианти в F8 – гена [23]. С изключение на инверсиите, болшинството от мутациите са уникални за определено семейство [8]. Относителното представяне на различни типове генетични дефекти, отбелязани в международната база данни е следното: инверсии – 48%; малки делеции – 16%; големи делеции – 13%; погрешно-смисленни мутации – 10%; мутации в splice - места – 7%; инсерции – 6% [9]. Не са установени “горещи” точки за възникване на мутации в гена за фактор VIII.

Генните инверсии в F8 – гена са свързани с тежка форма на хемофилия А и са отговорни за 45% от тежките случаи [1]. Инверсията с участие на интрон 1 и обърнатия извънгенен повтор също се свързва с фенотип, отразяващ тежката форма [4]. Точкови мутации, които водят до генерирането на стоп – кодони (nonsense) се асоциират с тежък фенотип, както и повечето

frameshift – мутации (мутации с изместване рамката на четене). Изключение прави инсерцията или делецията на А – бази (8-10), която може да се прояви в умерена форма [13]. Мутациите, засягащи splice – места обикновено са тежки, но могат да бъдат и леки в зависимост от специфичната промяна и локализация. Погрешно-смислените мутации (missense) се откриват в по-малко от 20% от индивидите с тежка форма на хемофилия А, но се срещат при почти всички пациенти с лека и умерена форма [7].

Inv1 и Inv22 – честота, механизъм и типове: Инверсията с участие на интрон 22 (Inv 22) се открива в 40% - 50% от пациентите с тежка форма на хемофилия А [10, 14]. Генната инверсия с точка на разкъсване в интрон 22 възниква посредством вътрехромозомна хомоложна рекомбинация между int22h1 – областта и едно от извънгенните копия на хомоложни секвенции (int22h2 и int22h3), локализирани в близост до теломера на дългото рамо на X – хромозомата [10, 14]. Тези теломерни последователности са в противоположна ориентация в сравнение с хомоложната им секвенция в интрон 22. При този процес на хомоложна рекомбинация се осъществява обръщане на ориентацията на интроните от 1 до 22 (**Фиг.1**). В зависимост от отдалечеността на извънгенното копие, включено в рекомбинацията, е възможно да бъдат разграничени дистална (тип I), проксимална (тип II) инверсия и редки варианти - при наличие на трето допълнително теломерно копие [1]. Установено е, че дисталната инверсия е по-често срещана от проксималната [1]. Инверсията с участие на интрон 22 възниква вследствие на грешка при репликацията по време на сперматогенезата при мъжете и не възниква по време на овогенезата при жените [1].

Механизмът, водещ до инверсия с точка на разкъсване в интрон 1 е сходен с описания по-горе с тази разлика, че последицата е не само дезинтеграция на F8 – гена, но също така и образуването на нов фузионен ген, чиято значимост е недоизяснена [4]. Разпространението на инверсията с участие на интрон 1 сред случаите с тежка форма на хемофилия А варира между 1-5% [4, 8].

Методи за детекция на Inv22: Съществуват няколко метода за детекция на голямата инверсия с участието на интрон 22 (Inv22). Класическият така наречен „златен стандарт“ е анализът по Southern [18]. Southern blotting анализът осигурява най-детайлна информация за типа инверсия – дистална или проксимална и има възможност с него да се детектират носители на мозаицизъм. [10] За съжаление методът е бавен и трудоемък и често се работи с опасни радиоактивни химикали. Това е наложило търсенето на други алтернативни подходи, базирани на PCR – технологията.

Един такъв метод е RT-PCR, който се основава на обратна транскрипция и амплификация на кДНК с използване на РНК – матрица и ензим обратна транскриптаза, при което се следи физическата връзка между екзони 22 и 23. В случай на настъпила инверсия с точки на разкъсване в интрон 22 е невъзможно да се проведе RT-PCR през границата екзон 22-23 [15]. Методът е бърз и чувствителен за откриване на експресия на гени, получени в резултат на хромозомно преустройство и не изисква голямо количество РНК. Недостатъците му са свързани с техническите трудности при изолиране на РНК, породени от лесното ѝ разграждане, което налага процедурата по изолиране на РНК да се извършва максимално бързо при стриктно спазване на температурен режим и стерилни условия.

Друг алтернативен метод, използван в редица лаборатории е LD PCR. Представлява модификация на стандартния PCR и е метод, при който се амплифицира набор от дълги (над 10 kb) ДНК – фрагменти. При наличие на инверсия с участието на интрон 22 на електрофоретичния профил се наблюдава допълнителен фрагмент, получен вследствие на рекомбинацията между вътрегенното копие на 9,5 kb повторена последователност и едно от извънгенните копия [11].

Методът е сравнително бърз и чувствителен и със сравнително висока специфичност при много добра оптимизация на условията за протичане. Недостатъци на LD-PCR представляват техническите трудности, които са свързани с амплифицирането на големи фрагменти ДНК и трудности при оптимизирането на условията за провеждане на метода. Това води до сравнително ниска възпроизводимост на метода, свързана с трудната му оптимизация.

В настоящото изследване за скриниращ метод за детекция на Inv 22 използвахме и оптимизирахме Inverse PCR (I-PCR) техниката, приложена за първи път от Rossetti и сътр. [17].

Материали и методи:

ДНК проби: Бяха изследвани 30 пациенти с тежка форма на хемофилия А и техни родственици с потвърдена клинична диагноза „тежка форма на хемофилия А” след предварително вземане на писмено информирано съгласие от всички участници в изследването. Геномната ДНК беше изолирана от левкоцити във венозна кръв по метод за екстракция на ДНК чрез изсолване на белтъците с използване на следните буфери и реактиви: Еритроцит лизиращ буфер: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA (pH 7.4); Нуклеолизиращ буфер (SE buffer): 75 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA (pH 8.0); Трис – EDTA буфер (TE buffer): 10mM TRIS/HCl (7.4 pH), 1mM EDTA (pH 7.4); Протеиназа К (10 mg/ml); 10% Натриев додецил сулфат (SDS); 6M NaCl; 80% Етилов алкохол [12].

Качеството на получената високомолекулна ДНК беше определено чрез агарозна гел електрофореза в хоризонтални електрофоретични вани (*Pharmacia*®) с използване на 1% агарозен гел и 1x TBE буфер. Визуализацията на фрагментите се осъществи посредством етидиев бромид с концентрация 0.05µl/ml на UV трансилюминатор (TFX-35, Life Technologies®).

Концентрацията на изолираната геномна ДНК беше определена спектрофотометрично чрез измерване на абсорбцията при дължина на вълните 260 nm и 280nm срещу контрола от TE буфер. Беше използван спектрофотометър *NANODROP*®.

I-PCR за детекция на Inv 22:

1-2 µg геномна ДНК беше рестрицирана за 12 часа в рестрикционна смес с обем 50 µl, съдържаща *VclI* ензим (10 u/ µl; *Fermentas*®) и 10 x G buffer с BSA при условия препоръчани от производителя. Фрагментираната ДНК беше оценена електрофоретично на 1% агарозен гел и беше подложена на екстракция с фенол и хлороформ/изоамилов алкохол (24:1), преципитирана с амониев ацетат и изопропанол в равни обеми, след което пробите бяха поставени на -20 °C за една нощ. Рестрикционните продукти бяха центрофугирани (15 мин./10 000 об./мин), преутаяни с 5 обема 80% етанол, изсушени утайките на термостат и разтворени в 50 µl H₂O. Лигазната реакция беше проведена за една нощ на 15 °C в общ обем от 300 µl (50 µl ДНК и 250 µl реакционна смес) с 5 U T4 ДНК Лигаза (*Thermo Scientific*®) и 10 x лигазен буфер при условия препоръчани от производителя. Лигазните продукти бяха подложени на екстракция и преутаяване при сходни условия с първоначалните рестрикционни продукти. Получените утайки бяха изсушени на термостат и разтворени в 30 µl H₂O. Получените в резултат на лигазната реакция В – пръстени бяха амплифицирани посредством стандартна PCR – реакция в мултиплексен вариант с използване на 3 праймера – IU (intragenic upstream; 5'-ССТТТСААСТССАТСТССАТ-3', ID (intragenic downstream; 5'-САСТАСГГТТТАГТСАСААГТ-3') и ED (extragenic downstream; 5'-ТССАГТСАСТТАГГСТСАГ-3') на автоматичен термоциклер на *Applied Biosystems*®. PCR – реакцията беше проведена с 6 µl кръгова ДНК и 19 µl реакционна смес, съставена от 250 U

Prime Taq ДНК – полимераза (Genetbio[®]), 0,2 μ M праймери, 1 000 μ M дезоксинуклеозидтрифосфати, 10 X Taq ДНК полимеразен буфер и dH₂O в общ обем от 25 μ l. Първоначалната стъпка на денатурация за 2 мин. на 94 °C, беше последвана от 40 цикъла, включващи денатурация на ДНК – матрицата, хибридизация на праймерите с нея и удължаване на ДНК – веригата с температури и продължителности съотв. 94 °C за 30 сек., 55 °C за 1 мин. и 72 °C за 1,30 мин. Крайното удължаване беше осъществено на 72 °C за 5 мин.

Агарозни гел- електрофорези за оценка на рестрикционните и PCR – продуктите: Рестрикционните продукти бяха анализирани посредством гел-електрофорези на 1% агарозни гелове, оцветени с етидиев бромид. PCR – продуктите бяха детектирани посредством бързи гел – електрофорези (45 – 50 мин.) на 2,5% гелове с използване на 50 bp ДНК – маркер (Fermentas[®]) за оценка големината на получените ДНК – фрагменти и оцветени с етидиев бромид. Електрофоретичните ивици в гела бяха документирани с фото-документационна система (Kodak[®] EDAS 290) .

Резултати и обсъждане: Скринингът за Inv1 и Inv22 е важен и съществен етап от системния ход за генетичен анализ на хемофилия А (**Фиг.2**). От литературни данни е известно, че двете големи втрехромозомни преустройства се срещат само при пациенти с тежка форма на заболяването и не се откриват при леките и междинни форми на болестта [8]. Това налага първо да се извърши скрининг за двете големи инверсии преди да се пристъпи към скриниране за точкови мутации, които преобладават при леките и междинните форми и се срещат при половината от случаите с тежка форма. В случай на положителен за някоя от инверсиите резултат, ДНК-анализът се прекратява, понеже това показва недвусмислено точния молекулен дефект, причинил заболяването. Ако тестът за Inv1 и Inv 22 е отрицателен, се пристъпва към анализ за мутации по цялото протежение на F8 – гена.

Високата честота на Inv22 (среща се приблизително при половината от пациентите с тежка форма) и невъзможността за детекция на двете големи инверсии с конвенционалните скриниращи и потвърждаващи методи за ДНК – анализ са наложили разработването на нови или модификации на вече съществуващи техники и подходи. Както стана ясно от изложението по-горе класическият анализ по Southern въпреки безспорните си предимства като висока чувствителност и специфичност е бавен, трудоемък и скъп, често свързан с използване на радиоактивни химикали. В случай, че се използват нерадиоактивни китове за белязане на сондите, се намалява чувствителността му. Всичко това е довело до търсенето на нови техники и подходи за детекция на двете големи инверсии. Към настоящия момент продължават да се предлагат различни модификации на основните методи за анализ, а именно RT-PCR, LD-PCR и I-PCR с цел оптимизацията им по отношение на бързина, специфичност, чувствителност и не на последно място цена на анализа [5]. Southern blotting методът се използва по-скоро за валидиране на резултатите от другите анализи като метод за потвърждение с цел недвусмисленост на резултатите на различните колективи, предлагащи новите методи или оптимизации на вече съществуващи такива. Нещо повече, той вече е рядко предпочитан метод за ДНК-анализ при хемофилия А за диагностични цели.

Първоначално I-PCR е предложен от Ochman и сътр. като бърза *in vitro* амплификация на ДНК – секвенции, които фланкират район с известна секвенция (**Фиг.3**). Методът използва PCR – реакция, но праймерите имат обратна ориентация. Матрица за обърнатите праймери е рестрикционен фрагмент, който е бил самолигиран за да образува пръстен [16].

В настоящето изследване за скриниращ Inv22 въведохме I-PCR метод, предложен от Rossetti и сътр. с оптимизации на условията при някои от стъпките [17]. След екстракцията на

фрагментираната ДНК и екстракцията на ДНК след лигиране, оставихме пробите с амониев ацетат и изопропанол на -20°C за цяла нощ и не използвахме NaCl, а при амплификацията на В – пръстени променихме циклите на PCR – реакцията от 30 на 40. Схемата на стратегията за анализ на Inv22 с I-PCR и анализът на агарозната гел – електофореза са показани на **Фиг.4**.

Бяха изследвани 30 пациенти с тежка форма на хемофилия А и техни родственици, от които 23 мъже (100%) с потвърдена клинична диагноза „тежка форма на хемофилия А”. При 7 от тях (30%) беше доказано наличието на Inv22 посредством I-PCR (**Фиг.5**). По-ниската честота на Inv22 при пациенти с тежка форма на хемофилия А, установена в настоящото изследване, в сравнение с литературни данни (42-50%), вероятно се дължи на по-малката извадка.

Въведеният и оптимизиран от нас скриниращ Inv22 метод е приложим за научно-изследователски и диагностични цели. Получената информация от генетичното изследване може да послужи за последваща генетична консултация за оценка на риска от поява на инхибитори към фактор VIII при конкретния пациент, за определяне на носителство при родственици на пациента и пренатална диагностика. Генетичните изследвания по време на бременността позволяват да се определи категорично дали плодът ще бъде засегнат от заболяването или няма риск да го развие и дават възможност на семейството да вземе предпочитаното решение след генетична консултация.

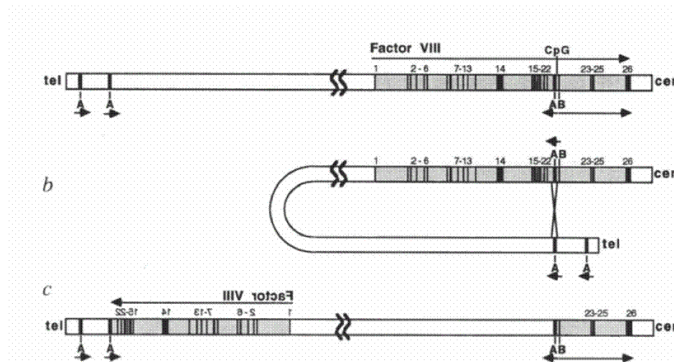
Изводи: Използваният подход за скриниране на Inv22 при пациенти с тежка форма на хемофилия А е чувствителен и възпроизводим за диагностични и изследователски цели, сравнително бърз (за разлика от хибридизация по Southern), относително евтин и приложим метод в системния ход на анализ на хемофилия А.

Литература:

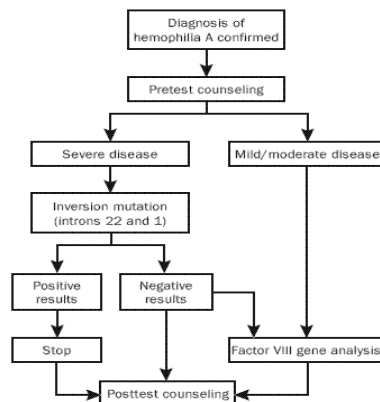
1. **Antonarakis, S. E.**, Rossiter, J. P., Young, M. et al.: Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood*, (1995), 86, pp. 2206-2212.
2. **Antonarakis, S. E.**; Kazazian, H. H.; Tuddenham, E. G. Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. *Hum. Mutat.* 5: 1-22, (1995).
3. **Arun, B, Kessler CM (2001)** Clinical manifestations and therapy of the hemophilias. In: Colman RW et al (eds) *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 4 ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 815-824.
4. **Bagnall, R. D.**, Waseem, N., Green, P. M., Giannelli, F.: Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*, (2002), 99, pp. 168-174.
5. **Dutta, D.**, Gunasekera, D., Ragni, M. V. and Pratt, K. P: Accurate, simple and inexpensive assays to diagnose F8 gene inversion mutations in hemophilia A patients and carriers, *Blood Advances* (2016), 1 (3), pp. 231-239.
6. **Gitschier, J.**, Wood, W. I., Goralka, T.M. et al.: Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, (1984), 312, pp. 326-330.
7. **Goodeve A. C. and Peake I. R.:** The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. *Semin Thromb. Hemost.*, (2003), 29: 23-30.
8. **Habart, D.:** The Molecular Pathogenesis of Hemophilia A. *Casopis Lekaru Ceskych*, (2005), 144, No. 11, pp. 727-733.
9. **Kemball-Cook, G., Tuddenham, E. G. D.:** HAMSTeRS. The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource Site (1999): http://europium.csc.mrc.ac.uk/WebPages/Main/road_map.htm
10. **Lakich, D.**, Kazazian, H H Jr, Antonarakis, S. E. and Gitschier, J. Inversions disrupting the

- factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A; *Nat. Genet.*, (1993), 5, pp. 236–241.
11. **Liu, Q.**, Nozari, G and Sommer, S. S: Single-tube Polymerase Chain Reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A, *Blood* (1999), 93(6), pp. 2141.
 12. **Miller, S. A.**, Dykes, D. D. and Polesky, H. F: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Research* (1988), 16 (3), pp. 1215.
 13. **Nakaya, S.**, Liu M. L., Thompson A. R.: Some factor VIII exon 14 frameshift mutations cause moderately severe haemophilia A. *Br. J. Haematol.*, (2001), 115: 977-982.
 14. **Naylor, J.**, Brinke, A., Hassock, S., Green, P. M. and Giannelli, F.: Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions; *Hum. Mol. Genet.* (1993) 2:1973–1978.
 15. **Naylor, J.A.**, Green, P. M., Rizza, C. R. and Giannelli, F: Factor VIII gene explains all cases of Haemophilia A, *Lancet* (1992), 340, pp. 1066-1067.
 16. **Ochman, H.**, Gerber, A. S. and Hartl, D. L: Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction, *Genetics* (1988), 120, pp. 621-623.
 17. **Rossetti, L. C.**, Radic. C. P., Larripa, I. B, and De Brasi, C. D: Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR, *Thrombosis and haemostasis* (2005), Cl. Ch. 51:7, pp. 1154-1158.
 18. **Southern, E. M:** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, (1975), 98(3), pp. 503-517.
 19. **Toole, J.J.**, Knopf, J.L., Wozney, J.M., et al.: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*, (1984), 312, pp. 342-347.
 20. **Vehar, G. A.**, Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W. I., Harkins, R. N., Tuddenham, E. G. D., Lawn, R. M. and Capon, D. J., (1984) Structure of human factor VIII; *Nature (London)* 312 337-342.
 21. **Wion, K. L.**, Kelly, D., Summerfield, J. A. et al.: Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*, (1985), 317, pp. 726-729.
 22. **Wood, W. I.**, Capon, D. J., Simonsen, C. C., et al.: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature*, (1984), 312, pp. 330-337.
 23. **www.factorviii-db.org**

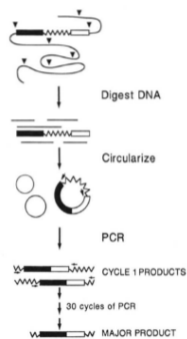
Използвани фигури:



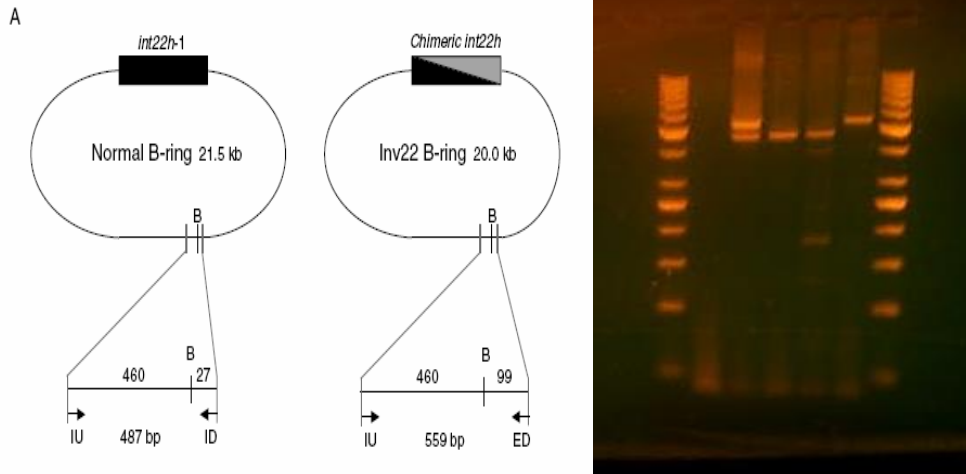
Фиг. 1 Инверсията с участие на интрон 22 се открива в 40% - 50% от пациентите с тежка форма на хемофилия А. Генната инверсия с точка на разкъсване в интрон 22 възниква посредством вътрехромозомна хомоложна рекомбинация между *int22h1* – областта и едно от извънгенните копия на хомоложни секвенции, локализирани в близост до теломера на дългото рамо на X – хромозомата. Тези теломерни последователности са в противоположна ориентация в сравнение с хомоложната им секвенция в интрон 22. При този процес на хомоложна рекомбинация се осъществява обръщане на ориентацията на интроните от 1 до 22.



Фиг.2 Алгоритъм за генетично изследване на пробанд с хемофилия А

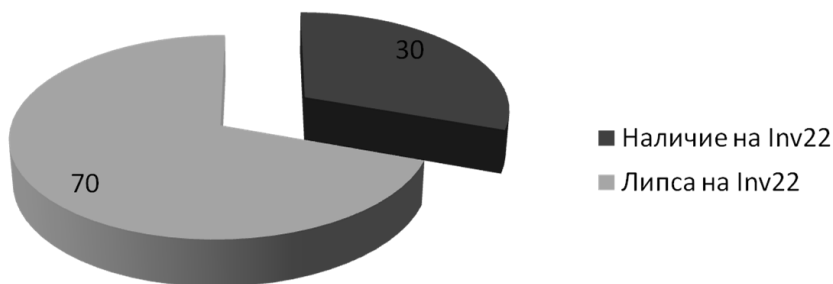


Фиг.3 Схема на I-PCR ДНК –последователността в сърцевинния регион е означена като зигзагообразна линия. Запълнените и празните правоъгълници представят *upstream* и *downstream* фланкиращите райони, респ. ДНК се смила посредством определена рестриктаза (рестрикцияните сайтове са обозначени с триъгълници), циклизира се при условия, благоприятстващи формирането на ДНК - пръстени и се амплифицира посредством PCR. Олигонуклеотидните праймери (конструирани да се свързват със сърцевинния район) и посоката на ДНК-синтеза са показани със стрелки.



Фиг.4 (А). Схема на стратегията за анализ I-PCR Inv22. Изобразени са два релевантни B-пръстена (самолигирани *BclI* фрагменти): ляв, 21,5-kb пръстен, който съответства на неанеанжираното копие на *int22h-1* (Normal B-ring): десен, 20 kb Inv22,- който обхваща химерно копие на *int22h*, съставено от част от *int22h-1* (интрагенно) и част от или *Int22h-2* (проксимално) или *Int22h-3* (дистално). Всеки пръстен се разпознава специфично чрез специфична PCR амплификация (долу на панела). Нормалните B-пръстени дават продукти с 487 bp с праймери IU и ID; Inv22 B-пръстените дават продукти с 559 bp с праймери IU и ED. Показани са праймерните таргетни сайтове, *BclI* B-места за разпознаване и размерите на PCR продуктите. (Б), анализ на агарозна гел-електрофореза, показващ 3 възможни генотипа: индивиди без наличие на (Inv22) (норма, четвърта и пета ивица). Жена носител (трета ивица) и пациент положителен за Inv22 с тежка ХА (шеста ивица), негативна PCR – контрола (втора ивица), 50 bp ДНК-маркер(първа и седма ивица).

Наличие или липса на Inv22



Фиг. 5 Графично представяне на получените резултати от скрининга за Inv22 (%) Бяха изследвани 23 индивида от мъжки пол с тежка форма на *Haemophilus A* (100%), като при 7 (30%) от тях посредством I-PCR установихме наличието на Inv22.