

HEMOFİLİ A HASTALIĞININ MOLEKÜLER GENETİK TEMELLERİ

Cemal ÜN¹

ÖZET

Hemofili A hastalığı 10.000 de 1 ortaya çıkan ve *FVIII* geni içerisindeki mutasyonlardan kaynaklanan bir hastalıktır. Hemofili A hastalığı kan içerisindeki FVIII düzeyine göre 3 değişik tipte sınıflandırılmaktadır ve bu hastalığı gösterenlerin yarısından çoğu ağır tip Hemofili A sınıfına girmektedir. *FVIII* geni çok büyük bir gen olup (~180 kb) yapısal olarak kompleks bir yapı göstermektedir (26 Ekzon). Bu gen X kromozomunun uzun kolu üzerinde Xq28 pozisyonunda yer almaktadır. Hemofili A hastaları insan kanından veya modifiye edilmiş hücre kültürlerinden elde edilen rekombinant FVIII in periyodik olarak damardan kana verilmesi ile tedavi edilmektedir. Son yıllarda hastalığın in vivo ve ex vivo gen terapisi yöntemleriyle tedavisi alanında önemli gelişmeler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hemofili A, *FVIII*, Mutasyon, Gen terapisi

Molecular genetic fundaments of Haemophilia A disease

SUMMARY

Haemophilia A, with a prevalence of 1 in 10.000 is caused by a deficiency of blood coagulation factor VIII (FVIII). Haemophilia A is categorized into severe, moderate, or mild forms, with over half of the patients manifesting the severe disease. The factor VIII gene is extremely large (~ 180 kb) and structurally complex (26 exons). *FVIII* gene is located towards the end of the long arm at Xq28. Current treatment of haemophilia A is directed toward replacing the missing clotting factor in response to bleeding crises with infusions of plasma-derived or recombinant FVIII. Considerable progress has been made recently in the development of adenoviral-mediated in vivo and ex vivo gene therapy of haemophilia A.

Key Words: Haemophilia A, *FVIII*, Mutation, Gene therapy

Hemofili A hastalığı insanlarda görülen en yaygın kanama hastalığı olup X kromozomuna bağlı olarak resesif kalıtım yoluyla geçmekte ve yaşam boyu devam etmektedir.^{1,2} *FVIII* geni içerisindeki değişik mutasyonlardan kaynaklanan hastalık bütün dünyada ve değişik ırklarda 10.000 de 1 ortaya çıkmaktadır.^{3,4} Hemofili A hastası olan bireyler kanın pıhtılaşmasında rol oynayan FVIII proteininin kanda ya normal düzeyinin altında olması ya da tamamen yok olmasından dolayı normal bireylerde görülenden daha uzun bir pıhtılaşma süresi göstermektedirler. Bu bireylerde asıl sorun dış kanamalardan çok eklem yerlerinde, kaslarda ve yumuşak dokularda meydana gelen iç kanamalardır. Kan içerisindeki FVIII düzeyine göre 3 değişik hemofili A tipi bulunmaktadır, hafif tip (< %25), orta tip (%1-5) ve ağır tip (<%1) hemofili A.

186 kb büyüklüğünde olan ve 26 değişik ekzondan oluşan *FVIII* geni X kromozomu üzerinde (Xq28) bulunmaktadır. Bu 186 kb lik genomik bölge toplam 2332 amino asiti kodlamaktadır. Genom içerisindeki lokalizasyonunun yapıldığı dönemde⁵ tanınan en büyük gen olan *FVIII* geni içerisinde bu güne kadar 600 ün üzerinde mutasyon belirlenmiştir

(<http://europium.csc.mrc.ac.uk/usr/WWW/WebPages/main.dir/main.htm>). Kan içerisinde FVIII oranını düşüren bu mutasyonlar tip itibarıyla büyük değişim göstermektedir, hastaların %40 ında intron 22 içerisindeki inversiyona rastlanırken, % 30-35 inde nükleotid değişimlerinden oluşan noktasal mutasyonlara (point mutations) rastlanmaktadır.^{6,7,8} Hastaların % 5-10 unda küçük delesyonlar ve insersiyonlar (deletions and insertions) tanımlanırken %5 inde büyük delesyonlar tanımlanmaktadır. *FVIII* geni ile hemofili A hastalığının bağlantısı açıkça ortaya koyulmuş olsada hemofili A hastalarının yaklaşık %2 sinin *FVIII* geni içerisinde mutasyonlara rastlanmamıştır.⁹ Bu durum hemofili A hastalarının en azından % 2 sinde hastalığa yol açan başka lokusların varlığını gündeme getirmektedir. Bu lokusların FVIII proteininin Von willebrand faktörüne (VWF) bağlantı noktalarını kodlayan sekanslarda¹⁰ yada *ERGIC-53* geni içerisinde^{11,12} yer aldığı değişik araştırmalarda ortaya çıkmıştır.

Hemofili A hastalığı insan kanından veya modifiye edilmiş hücre kültürlerinden elde edilen rekombinant FVIII in periyodik olarak intravenöz yol ile kana verilmesi ile tedavi edilmektedir.¹³ Ancak bu yöntemi sınırlayıcı bazı

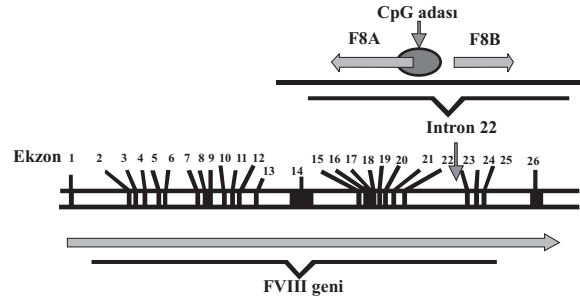
¹ GSF-National Research Center for Environment and Health, Institute of Developmental Genetics, D-85764 Neuherberg, GERMANY

etkenler söz konusudur. Enfeksiyöz hastalıkların kan yoluyla hemofili hastalarına bulaşması ve bağışıklık sisteminin rekombinant FVIII e gösterdiği reaksiyon bu sorunların başlıcalarıdır. Ağır tip hemofili A gösteren hastaların % 30 unda bağışıklık sistemi rekombinant FVIII preparatlarını nötralize etmekte ve bu da terapi olanağını yok etmektedir. Bu sorunu aşmak ve yaşam boyu bir tedavi uygulayabilmek için gen terapisi gündeme gelmektedir. Hemofili A hastalığının gen terapisi yoluyla tedavisi alanında farelerde^{14,15} ve köpeklerde^{16,17} yapılan çalışmalar adenoviral yöntemin başarılı olduğunu göstermiş ancak bu çalışmalarda FVIII düzeyinin artış göstermesi ve bu yüksek düzeyde kalması sürekli olmamış, kısa sürmüştür.

FVIII geninin yapısı

FVIII geni 26 ekzondan oluşan 180 kb lik büyük bir gen olup X kromozomunun uzun kolu üzerinde Xq28 pozisyonunda yer almaktadır. 26 ekzon içerisinden ekzon 14 (3106bp) ve ekzon 26(1958bp) büyük ekzonları oluşturmaktadır. Ekzon 14 bütün genin yaklaşık % 40 ını oluşturmaktadır. Diğer ekzonların büyüklüğü 69 bp (ekzon 5) ile 313 bp (ekzon 1) arasında değişmektedir. FVIII in ekzonları arasında yer alan intronların büyüklüğü ise 200 bp (intron 17) ile 32,4 kb (intron 22) arasında değişim göstermektedir. Intron 22, FVIII geni içerisindeki en büyük intron olmasının yanı sıra özel yapıyla da önem taşımaktadır. Bu intron içerisinde F8A ve F8B adı verilen ve FVIII proteininin yapımında rol almayan iki küçük gen lokalize olmuştur. F8A geni 837 bp büyüklüğünde olup FVIII genine ters yönde kodlarken F8B geni 651 bp büyüklüğünde olup FVIII geniyle aynı yönde kodlamaktadır. İki gen arasında bir CpG adası (CpG island) bulunmakta ve her iki gen içinde çift taraflı olarak promoter görevi yapmaktadır. F8A ve CpG adası birlikte yaklaşık 9,5 kb büyüklüğünde olup int22h olarak adlandırılmakta ve intron 22 içerisinde birden çok homolog kopyeler halinde görülmektedir (int22h-1, int22h-2, int22h-3).

FVIII geni 6 değişik yapısal kısımdan (domain) oluşmaktadır. Bu yapısal farklılık gösteren kısımlar A1, A2, B, A3, C1 ve C2 kısımlarıdır. A1, A2 ve A3 kısımları kendi içerisinde C1 ve C2 kısımları ise kendi içerisinde homolog yapı göstermektedirler.¹⁸



Şekil 1: FVIII geninin genomik yapısı. FVIII geni 26 ekzon ve 25 introndan oluşmaktadır. F8A ve F8B genleri intron 22 içerisine lokalize olmuş FVIII proteininin yapımında rol almayan iki intronik genidir.

FVIII geni içerisindeki mutasyonlar

FVIII geni içerisinde bu güne kadar analizi yapılmış mutasyonlar ve polimorfizmler (<http://europium.csc.mrc.ac.uk/usr/WWW/WebPages/main.dir/main.htm>) sayfasında listelenmiştir. Bu sayfada gerek yayınlanmış gerekse yayınlanmamış bütün gen değişimlerinin kaydedildiği bir sayfa olup ayrıca FVIII geniyle ilgili diğer bilgileride içermektedir (primerler, metodlar vb.).

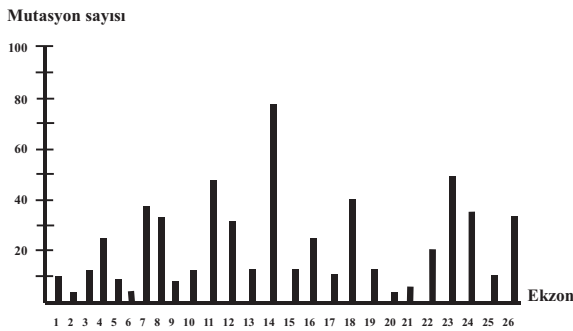
Kan içerisinde FVIII oranını düşüren mutasyonlar tipleri bakımından büyük değişim göstermektedirler. Hastaların % 40 ında intron 22 içerisindeki inversiyona rastlanırken, % 30-35 inde nükleotid değişimlerinden oluşan noktasal mutasyonlara (point mutations) rastlanmaktadır. Hastaların % 5-10 unda küçük delesyonlar ve insersiyonlar (deletions and insertions) tanımlanırken % 5 inde büyük delesyonlar tanımlanmaktadır.

Intron 22 inversiyonu intronik gen F8A ile X kromozomunun telomer bölgesi üzerinde lokalize olmuş bir gen arasındaki krossingover sonucu meydana gelmekte ve FVIII geninin ekzon 1 den ekzon 23 e kadar olan bölümünü ekzon 23 den sonraki kısımdan parçalamakta ve sonuç olarak ağır tip hemofili hastalığına yol açmaktadır.^{19,20} Intron 22 inversiyonu hemofili a hastalarının mutasyonlarının araştırılmasında ilk olarak test edilebilecek derecede sık görülen bir mutasyondur. Bu inversiyon dışında intron 1 içerisinde hemofili hastalarının yaklaşık % 5 inde rastlandığı belirtilen başka bir inversiyon Bagnall ve çalışma arkadaşları tarafından bildirilmiştir.²¹ Intron 1 içerisindeki bu inversiyon FVIII geninin 1. ekzonunu genden ayırmakta ve X kromozomunun telomer bölgesindeki C6.1A geninin yanına başına lokalize etmektedir. Inversiyon intron 22 ve inversiyon intron 1

dışında *FVIII* geni içerisinde yaygın olarak görülen başka inversiyona rastlanmamıştır.

FVIII geni içerisinde meydana gelen deletion, insertion ve STOP-kodonuna neden olan noktasal mutasyonlar(nonsens mutations) gerek amino asit kodlanması sırasındaki değişimlerle gerekse kodlanmanın sona erdirilmesiyle *FVIII* proteininin premature kalmasına neden olmaktadır. Bu tür mutasyonlar yukarıda açıklanan etkileri dolayısıyla intron 22 inversiyonunda olduğu gibi ağır tip hemofili A hastalığına yol açmaktadır. Noktasal mutasyonlar içerisinde çoğunluğu TC ve AG mutasyonlar oluşturmaktadır.

Bu mutasyonlar dışında *FVIII* geni içerisinde ayrıca kodlama yapmayan bölgeler (Intronlar) içerisinde polimorfizmlerde analiz edilmiştir. Bu polimorfizmlerin çoğu SNP (single nucleotide polymorphism) olup RFLP (restriction fragment length polymorphisms) kategorisine girmektedirler. SNP lerin yanı sıra biri intron 13²² diğeri intron 22²³ içerisinde olmak üzere *FVIII* geni içerisinde 2 mikrosatellitin analizi yapılmıştır.



Şekil 2: Nokta mutasyonların *FVIII* geni ekzonları içerisindeki dağılımı.

Mutasyon analiz yöntemleri

İlk aşama olarak polimeraz zincirleme reaksiyonundan (PCR-Polymerase chain reaction) yararlanarak *FVIII* geni içerisindeki mutasyonları araştıran, dizi analizi-sequencing,^{24,25} DGGE (Denaturing gradient gel elektroforez),²⁶ CMC (chemical mismatch cleavage)²⁷ ve SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)²⁸ yi de içeren bir çok metod uygulanmaktadır. Zaman açısından daha hızlı ve laboratuvar gereçleri bakımından daha ucuz olması bakımından DGGE, SSCP ve CMC metodları dizi analizine oranla daha yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin

uygulanmasıyla mevcut mutasyonların ancak %95-97 kadarı tespit edilebilmektedir²⁹. Bu metodlar uygulandıktan sonra mutasyonları analiz edilemeyen Hemofili A hastalarının *FVIII* genlerine ait ekzonların sıra dizilişi analizinin yapılması mutasyon analizleri bakımından yararlı olacaktır.

FVIII geninin çok büyük bir yapı göstermesinden dolayı mutasyon araştırmalarının uzun bir çalışmayı gerektirmesi, özellikle prenatal analizlerde ve taşıyıcı kontrollerinde gen içerisinde bulunan polimorfizmlerden yararlanarak bağlantı analizinin (Linkage analysis) yapılmasını alternatif bir metod olarak gündeme getirmiştir. Bağlantı analizlerinin yapılmasında özellikle RFLP ler yoğun olarak kullanılmaktadır³⁰.

Hemofili A hastalığının gen terapisi yöntemiyle tedavisi olanakları

Hemofili A hastaları günümüzde insan kanından veya modifiye edilmiş hücre kültürlerinden elde edilen rekombinant *FVIII* in periodik olarak damardan kana verilmesi ile tedavi edilmektedir.¹³ Bu yöntemi sınırlayıcı bazı etkenlerin söz konusu olması (enfeksiyöz hastalıkların kan yoluyla hemofili hastalarına bulaşması ve bağışıklık sisteminin rekombinant *FVIII* e gösterdiği reaksiyon gibi) bu sorunu aşmak ve yaşam boyu bir tedavi uygulayabilmek için gen terapisini gündeme getirmektedir. Ağır tip hemofili A gösteren hastaların % 30 unda bağışıklık sistemi rekombinant *FVIII* preparatlarını nötralize etmekte ve buda terapi olanağını yok etmektedir. Bu hastalarda bağışıklık sisteminin gösterdiği tepkiyi tedavi edebilmek için 1-2 yıl süreyle çok yüksek düzeylerde *FVIII* uygulanması gerekmektedir. Bu uygulama hem zaman alıcı hemde milyonlarca Euro gerektiren çok pahalı bir yöntemdir.³¹ Bu faktörlerin yanısıra hemofili A hastalığının klinik yapısının ve *FVIII* in etki mekanizmasının çok iyi araştırılmış olması, *FVIII* in kan içerisindeki düzeyinin çok az bir miktar artırılmasıyla bile Hemofili A hastalığının fenotipinde belirgin bir iyileşme olması ve genterapisinin tedavi masraflarını azaltacak bir yöntem olacağı beklentisi Hemofili A hastalığı üzerinde gen terapisi çalışmaları yapılmasını cazip hale getirmektedir. Hemofili hastalığının gen terapisi yoluyla tedavisi alanında farelerde^{14,15} ve köpeklerde^{16,17} yapılan çalışmalarda adenoviral

yöntemle başarılı sonuçlar elde edilmiş ancak bu çalışmalarda FVIII düzeyinin artış göstermesi ve bu yüksek düzeyde kalması kısa sürmüştür.

Hemofili A hastalığıyla ilgili yapılan çalışmalar temel olarak ex vivo gen terapisi ve in vivo gen terapisi olmak üzere iki metoda dayanmaktadır. Ex vivo gen terapisi yönteminde retrovirüsler aracılığıyla fare fibroblastları içerisine yerleştirilen (ex vivo protokol) *FVIII* geni, daha sonra fibroblastlarla birlikte farelerin vücuduna transfer edilmektedir. Bu yöntemle Hemofili B dolayısıyla *FIX* üzerine yapılan çalışmalar 1988 yılında başlamış olmasına rağmen Hemofili A ya uygulanması *FVIII* geninin büyüklüğünden dolayı daha sonraları başlamıştır. *FVIII* geninin 3 kb lik bir kısmının (B-kısmı) bu çalışmalarda kullanılması fikrinin ortaya atılmasıyla bu çalışmalar hız kazanmıştır.³² Ancak bu yöntemle yapılan çalışmalar başarılı olsada kan içerisindeki FVIII düzeyini sadece geçici ve kısa bir süre için yükseltmişlerdir. Uygulanmasının kolay olması bakımından in vivo gen terapisi yöntemi daha sıklıkla kullanılmaktadır. Bu metodda *FVIII* genini içeren gen transfer vektörleri ya doğrudan enjekte edilmekte ya da seçilen dokular içerisine doğrudan ya da intravenöz olarak verilmektedir. Bu yöntemin FVIII düzeyinin yükseltmesi amacıyla ilk kullanılışı 1995 yılında³³ olmuştur. Bu yöntem kullanılarak FVIII düzeyi yaklaşık 9 ay süreyle yüksek düzeyde tutulabilmektedir.

Sonuç

Hemofili A hastalığı yaşamı tehdit etse de ölümcül bir hastalık olmayıp tedavisi mümkün bir hastalıktır. Ancak tedavisinin hasta başına yıllık yaklaşık 50.000 Euro civarında olması nedeniyle çoğu hastanın bu tedavi imkanlarından yararlanması mümkün olmamaktadır. Dünya çapında Hemofili A hastalarının ancak %20 si bu hastalığın tedavi imkanlarından yararlanabilmektedir.³⁴ *FVIII* geninin çok büyük bir gen olması ve hastalığa neden olan mutasyonların büyük varyasyon göstermesi hastalığın moleküler analizini zorlaştırmaktadır. Bu gün Hemofili A hastalığının gen terapisi ile tedavi edilmesi alanında model hayvanlar üzerinde önemli mesafeler katedilmiş olsada, insanlarda bu hastalığın tedavisi için kullanılabilecek bir protokol bulunmamaktadır. Adenovirüslerle yapılan çalışmalar Hemofili A hastalığının gelecekte gen terapisi ile tedavisi

konusunda ümit vermektedir. Bu alanda her yıl yeni mesafeler katedilmekte ve giderek bu günkü tedavinin yerini alabilecek gen terapisi protokolü ne dahada yaklaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kemball-Cook G, Tuddenham EG. The factor VIII mutation database on the World Wide Web: the haemophilia A mutation, search, test and resource site. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:128-132.
2. Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, Vanzieleghem B, d'Oiron R, Lavergne JM, Brackmann HH, Schwaab R, VandenDriessche T, Marinee KL, Chuah, MH, Gilles JGG, Peerlinck J, Vermylen J, Jean-Marie R, A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood* 2000;96: 958-965.
3. Timur AA, Gurgey A, Aktuglu G, Kavakli K, Canatan D, Olek K, Caglayan SH. Molecular pathology of haemophilia A in Turkish patients: identification of 36 independent mutations. *Haemophilia* 2001;7:475-81.
4. Tuddenham EGD, Schwaab R, Seehafer J, Millar DS, Gitschier J, Higuchi M, Bidichandani M, Connor JM, Hoyer LW, Yoshioka A, Peake IR, Olek K, Kazazian HH, Lavergne JM, Giannelli F, Antonarakis SE, Cooper DN Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene, second edition. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:351-3.
5. Gitschier J, Wood W. I, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. Characterisation of the human factor VIII gene. *Nature* 1984;312:326-30.
6. Becker J, Schwaab R, Möller-Taube A, Schwaab U, Schmidt W, Brackmann HH, Grimm T, Olek K, Oldenburg J Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation typedependent sex ratio of mutation frequencies. *Am. J. Hum. Genet.* 1996;58:657-670.
7. Lakich D, Kazazian HH jr, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene as a common cause of severe hemophilia A. *Nat Genet* 1993;5: 236-41.
8. Marco Leuer M, Oldenburg J, Lavergne JM, Ludwig M, Fregin A, Eigel A, Ljung R, Goodeve A, Peake I, Olek K. Somatic Mosaicism in Hemophilia A: A Fairly Common Event. *Am. J. Hum. Genet.* 2001;69: 75-87.
9. El-Maarri O, Kavakli K, Caglayan SH. Intron 22 inversions in the Turkish haemophilia A patients: prevalence and haplotype analysis. *Haemophilia* 1999 May;5(3):169-73.
10. Schneppenheim R, Budde U, Obser T, Brassard J, Mainusch K, Ruggeri ZM, Schneppenheim S, Oldenburg J, Schwaab R. Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease. *Blood* 2001;97:2059-66.
11. Itin C, Roche A-C, Monsigny M, Hauri H-P ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins.

- Mol Biol Cell 1996;7:483.
12. Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, Terry VH, Hertel CH, Wheatley MA, Moussali MJ, Hauri HP, Ciavarella N, Kaufman RJ, Ginsburg D. Mutations in the ER-Golgi Intermediate Compartment protein ERGIC-53 Cause Combined Deficiency of Coagulation Factors V and VIII. *Cell* 1998;93: 61-70.
 13. Schwaab R, Albert T, Brackmann HH, Srouf M, Oldenburg J. Gentherapie der Hämophilie. *Biospektrum*. 2002;2:2-8.
 14. Connelly S, Andrews JL, Gallo AM, Kayda DB, Qian J, Hoyer L, Kadan MJ, Gorziglia ML, Trapnell BC, McClelland A, Kaleko M Sustained Phenotypic Correction of Murine Hemophilia A by In Vivo Gene Therapy. *Blood* 1998;91: 3273-3281.
 15. Sarkar R, Gao GP, Chirmule N, Tazelaar J, Kazazian HH Jr. Partial correction of murine hemophilia A with neo-antigenic murine factor VIII. *Hum. Gene. Ther.* 2000;11(6):881-94.
 16. Connelly S, Mount J, Mauser A, Gardner JM, Kaleko M, McClelland A, Lothrop CD Jr. Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood* 1996;88:3846-3853.
 17. Gallo-Penn AM, Shirley PS, Andrews JL, Tinlin S, Webster S, Cameron C, Hough C, Notley C, Lillcrap D, Kaleko M, Connelly S. Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood* 2001;97:107-113.
 18. Saenko EL, Scandella D. A Mechanism for inhibition of factor VIII binding to phospholipid by von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1995;270:13826-13833.
 19. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green P, 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(11):1773-1778.
 20. Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, Savidge GF. The identification and classification of 41 Novel Mutations in the Factor VIII gene (F8C). *Human Mutation* 2002; 19:274-278.
 21. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Gianelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002;99:168-174.
 22. Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG. Haemophilia A diagnosis by analysis of a novel dinucleotide tandem repeat sequence within the factor VIII gene. *Br. J. Haematol.* 1994;86(4):804-809.
 23. Lalloz MR, McVey JH, Pattinson JK, Tuddenham, EG. Haemophilia A diagnosis by analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991;338:20711.
 24. Wong C, Dowling CD, Saiki RK, Higuchi RG, Erlich H, Kazazian HH. Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 1987;330: 384-386.
 25. Higuchi M, Antonarakis SE, Kasch L, Oldenburg J, Economou-Petersen E, Olek, K, Arai M, Inaba H, Kazazian HH Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1991;88(19):8307-8311.
 26. Higuchi M, Wong C, Kochhan L, Olek K, Aronis S, Kasper CK, Kazazian HH, Antonarakis SE. Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Genomics* 1990;6: 65-71.
 27. Waseem NH, Bagnall R, Green PM, Gianelli F. Start of UK confidential haemophilia A database: analysis of 142 patients by solid phase fluorescent chemical cleavage of mismatch. *Haemophilia centres. Thromb. Haemost.* 1999;81:900-905.
 28. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86:276-670.
 29. Uen C, Klopp N, Oldenburg J, Brackmann HH, Schramm W, Schwaab R, Graw J. 11 novel mutations in the Factor VIII encoding gene lead to severe or moderate Hemophilia A. in: 32th Hemophilia Symposium Hamburg 2001; eds: Scharrer, I., Schramm, W., *Springer Verlag Berlin*, 2002; in press.
 30. Lalloz MRA, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG Hemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br. J. Haematol.* 1994;86:8049.
 31. Brackmann HH, Oldenburg J, Schwaab R. Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitors-twenty years Bonn protocol. *Vox Sang* 1996;70 (suppl):30-35.
 32. Hoeben RC, Fallaux FJ, Cramer SJ. Expression of the blood-clotting factor-VIII cDNA is repressed a transcriptional silencer located in its coding region. *Blood* 1995;85:2447-2454.
 33. Connelly S, Smith TAG, Dhir G, Gardner JM, Mehaffey MG, Zarte KS, McClelland A, Kaleko M. In vivo delivery and expression of physiological levels of functional human factor VIII in mice. *Hum. Gen. Ther.* 1995;6: 185-193.
 34. Graw J, Klopp N, Brackmann HH, Schwaab R, Oldenburg J, Schramm W. Genotyp-Phenotyp-korrelation bei der Hämophilie A. *Biospektrum.* 2001;3:217-219.

YAZIŞMA ADRESİ

Dr. Cemal ÜN
GSF-National Research Center for Environment and Health, Institute of Developmental Genetics, Ingolstaedterlandstr. 1 D-85764 Neuherberg, GERMANY

Tel : +49-89-31872408
Fax : +49-89-31872210
e-mail : uen@gsf.de
Http://www.gsf.de/idg/groups/molecular_eye/staff.html

Geliş Tarihi : 12.07.2002
Kabul Tarihi : 24.11.2002