

## Türk Hemofili B Hastalarında Faktör IX Geni Mutasyonları

### *Factor IX Gene Mutations in Turkish Haemophiliacs*

Oğuz ÇİLİNGİR<sup>1</sup>, M.Hamza MÜSLÜMANOĞLU<sup>1</sup>, Muhsin ÖZDEMİR<sup>1</sup>,  
Kaan KAVAKLI<sup>3</sup>, Mustafa SOLAK<sup>2</sup>, Sevilhan ARTAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, Eskişehir

<sup>2</sup> Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Afyonkarahisar

<sup>3</sup> Ege Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, İzmir

**ÖZET:** Hemofili B hastalığının nedeni, kanın temel fonksiyonları arasında bulunan koagülasyon mekanizmasında etkin olan faktör IX'un konjenital eksikliği veya disfonksiyonel olmasıdır. Faktör IX'u kodlayan gen, X kromozomunun q27.1 bandında lokalize olup, 34 kilobaz (kb) uzunluğunda ve 8 ekzon ile 7 introndan oluşmaktadır. Hem genotipik hem de fenotipik olarak oldukça heterojen bir yapıda olan hemofili B hastalığının şiddeti, gendeki mutasyonun lokalizasyonu ve yapısıyla yakından ilgilidir. Bu çalışmadaki temel amaç, yüksek heterojenite gösteren faktör IX geninde, hızlı, efektif ve kesin sonuç veren otomatik kapiller jel elektroforezi ile DNA baz dizileme yöntemi kullanarak, kesin moleküler tanıya gidilmesi, yöntemin avantajlarının belirlenmesi ve Türk popülasyonundaki mutasyon profilinin ortaya çıkartılmasına yönelik çalışmalara ışık tutmasıdır.

Yapılan çalışmada, klinik olarak tanısı konmuş 13 hemofili B hastasında, otomatik kapiller jel elektroforezi yöntemi ile DNA dizi analizi yapılarak mutasyonlar taranmış ve 2'si yeni olmak üzere 11 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Tespit edilen mutasyonlar en çok (%33) 8. ekzon bölgesinde gözlenmiştir. Ayrıca, faktör IX geninin CpG'den zengin bölgelerinde mutasyonların daha çok (%36) olduğu görülmüş ve missens mutasyonların faktör IX geninde hastalığa en fazla (%46) neden olan mutasyon tipi olduğu, literatürle de uyum gösteren bir şekilde ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, kapiller DNA dizi analizi yönteminin, faktör IX geni mutasyonlarının tanımlanmasında hızlı ve etkili bir yaklaşım olduğunu ve bu çalışmanın sonuçlarının, Türk popülasyonunun faktör IX geni mutasyon profilinin belirlenmesi ile ilgili başka çalışmalara da ışık tutacağını düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Hemofili B, otomatik kapiller jel elektroforezi, DNA baz dizilemesi, moleküler tanı, faktör IX.

**ABSTRACT:** Hemophilia B is an X linked coagulopathy due to deficiency of clotting factor IX. The gene for factor IX is situated on the long arm of the X chromosome at band Xq27.1, and spans 34kb. It consists of eight exons and seven introns. The clinical and molecular basis of hemophilia B is heterogeneous and the clinical severity is related to the location and type of genetic mutation.

The main purpose of this study was to perform molecular diagnosis of hemophilia B disease by DNA sequence analyses of the promoter, poly A and coding regions of the factor IX gene. To evaluate the efficiency of this technique in the diagnosis of factor IX gene mutations and light up further studies that aim to obtain mutation profile of the factor IX gene specific to Turkish population.

By this aim, blood samples from thirteen clinically diagnosed hemophilia B patients were analysed by the automatic capillary gel electrophoresis technique. At least one mutation was identified in the patients, except one case with mild hemophilia B. Of 11 identified molecular abnormalities, two were new mutations according to "Hemophilia B mutation bank" data of the recognised mutations. The most frequently seen mutations (33%) were localised at the exon 8 of the factor IX gene. The frequency of mutations was higher in the CpG rich regions of the gene and missense mutations was regarded as the most common type of mutations causing severe hemophilia B and this conclusion was in accordance with the literature.

In conclusion, we suggested that capillary DNA sequencing is a fast and efficient approach to identify mutations in the factor IX gene and the results of this study will light up further studies in obtaining the factor IX gene mutation profile of the Turkish population.

**Key Words:** Hemophilia B, automatic capillary gel electrophoresis, DNA sequence analyses, molecular diagnosis, factor IX.

## GİRİŞ

Hemofili B (HB), insidansı erkeklerde yaklaşık otuz binde bir olan X kromozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır (1-5). Hastalık, pıhtılaşma faktörü IX 'da meydana gelen bir defekt nedeniyle ortaya çıkan cinsiyete bağlı, resesif, hemorajik bir

bozukluktur (6). Faktör IX geni yaklaşık 34 kb uzunluğunda, 8 ekzonik bölgeden oluşmakta olup m-RNA 2803 baz uzunluğudur (7-9). Gen, kısa bir 5'-okunmayan bölge (29 baz), bir open reading frame, bitiş kodonu (1383 baz) ve bir 3'-okunmayan bölge (1390 baz) içerir (10). Günümüze kadar HB hastalarında geniş moleküler heterojenite gösteren bir çok mutasyon saptanmıştır (3). Nokta mutasyonlar (tek nükleotid değişimleri) en yaygın gen defektidir ve hastaların yaklaşık %90'ında görülür. İnseriyonlar ve yeniden düzenlenmeler HB hastalarında oldukça nadir görülürken, delesyonlar en yaygın ikinci gen defekti olup hastaların yaklaşık %5-%10'unda görülmektedir (11).

Günümüze kadar, farklı çalışmalar bir çok hastanın, faktör IX geni esansiyel bölgelerinde bir hasara sahip olduğunu göstermiştir (12-14). Bu bölgeler, 5'-promotor sekansı, ekzonlar, intron-ekzon sınırları ve poliadenilasyon sinyal dizisi etrafındaki 3' bölgesidir. Bu yüzden, mutasyon taraması için en direk strateji, hasta genomik DNA'sının faktör IX gen bölgesinin amplifikasyonu ve sonrasında mutasyon tarama amaçlı dizileme reaksiyonu için bu PCR ürünlerinin kullanılmasıdır. Faktör IX geninin 8 ekzon içermesi ve bu ekzonların en büyüğünün 2 kb'den küçük olması genin gerekli bölgelerinin küçük amplifikasyonlarla çoğaltılabilmesini ve kolay bir şekilde dizilenebilmesini mümkün kılmaktadır.

HB hastalığında, faktör IX geninde bulunan mutasyonlar üzerinde yapılan çalışmalar faktör IX gen ürününün yapısı ve fonksiyonu ile regülasyonu arasındaki ilişkileri göstermesi bakımından önem arz etmektedir. Ayrıca bu mutasyonların karakterizasyonu, doğru taşıyıcı tanısı yapılması ve prenatal tanı testlerinin geliştirilmesi için doğrudan klinik uygulamaya sahiptir (6).

Faktör IX geni gibi heterojenite gösteren gen yapılarında en etkili yöntemin direkt DNA baz dizileme yöntemi olduğu genel olarak kabul edilmektedir (2,13,15,16). Ancak yine de günümüze kadar bir çok moleküler analiz yöntemi uygulanmış olup, farklı popülasyonlara özgü haplotip analizleri yapılarak hot-spot bölgeler tanımlanmaya çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmaların hastalığın tanısında kesin olarak güvenilir olamaması sebebiyle, referans yöntem olarak kabul edilen DNA baz dizileme yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Etkili olmasına rağmen, uzun ve zahmetli bir çalışma gerektiren DNA baz dizileme yöntemi, günümüzde otomatik kapiller jel elektroforezi sayesinde çok daha kolay, hızlı ve efektif bir hale gelmiş, bu konudaki stratejilerin değişmesine neden olmuştur (13).

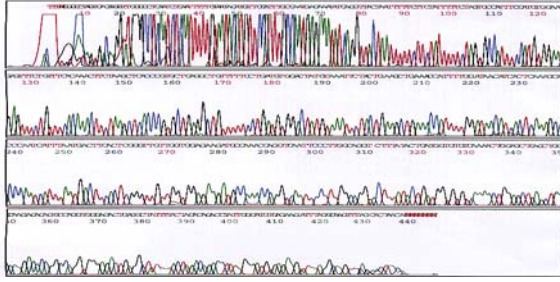
Faktör IX genindeki mutasyonların PCR reaksiyonunun ardından direkt DNA baz dizilenmesi yolu ile yapılabilmesi, informatif segregasyon "marker"larının kullanılması ile probandin akrabalarının taranması ve hastalığın aile hikayesinin çıkarılması zorunluluğunu da ortadan kaldırmıştır.

Türk popülasyonundaki faktör IX geninin moleküler analizinin detaylı bir şekilde yapılabilmesi, mutasyon dağılımının ve varsa yeni mutasyonların belirlenebilmesi, genin promoteri, poly A ucu ve tüm ekzonlarının dizilenerek kesin moleküler tanıya ulaşılabilmesi amaçlarını gerçekleştirmek üzere planlanmış olan bu çalışmada, 13 HB hastasında otomatik kapiller jel elektroforezi yöntemi ile DNA baz dizilemesi yapılarak bulgular ortaya konmuştur.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 13 Türk HB hastasından kan örnekleri alınmış ve standart teknikler kullanılarak genomik DNA ekstraksiyonları yapılmıştır. Kullanılan primerler, pozisyonları ve uzunlukları Tablo 1 ve 2'de verilmiştir 5-12 ngr DNA kullanılarak DNA amplifikasyonları yapılmıştır. Reaksiyon miksinde her bir primer 4pmol, 1 İÜ Ampli Taq Gold polimeraz, 100mM Tris (pH 8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub> ve 200 µmol dNTP bulunmaktadır. Bu karışım DNA'yı denatüre etmek ve polimerazı aktive etmek için 7 dk 94°C'de ısıtılmıştır. Isı döngüleri (35 döngü, 1dk 95°C'de denatürasyon, 1dk bağlanma, 1 dk uzama) Tablo 1'de verilen ısılarda termocycler'da uygulanmıştır.

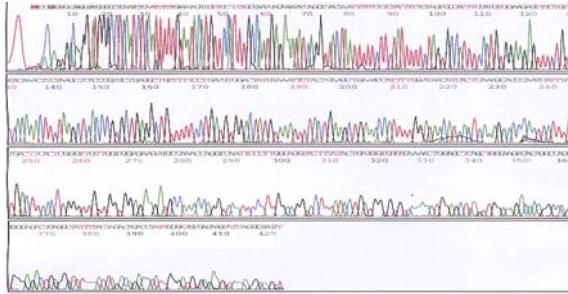
Amplifikasyon reaksiyonlarını takiben PCR ürünleri amplifikasyon sonuçlarını belirlemek için %3'lük agaroz jel elektroforezide yürütülmüştür. Amplifiye olmuş PCR ürünleri High Pure PCR Purification Kit kullanılarak pürifiye edilmiş ve 30-90ngr PCR ürünü ile Big-Dye Terminator Reaksiyon kiti, döngü dizileme reaksiyonuna sokularak (PE Biosystems) reaksiyon her bir PCR primerinden 3.2 pmol olacak şekilde termocycler'da devam ettirilmiştir. Döngü-dizileme reaksiyonunda; 10sn 96°C'de denatürasyon, 5 sn, 50°C'de bağlanma, 4sn 60°C'de uzama olarak 25 döngü uygulanmış, döngü dizileme reaksiyonundan çıkan ürünler etanol presipitasyonu ile pürifiye edilerek kurutulmuş, tekrar suspande edilmiş ve otomatik kapiller jel elektroforez cihazında (ABI 310) dizilemesi yapılarak mutasyonlar ortaya konmuştur (Şekil 1 ve 2). Faktör IX geninde dizilenen DNA baz bölgeleri Tablo 3'te belirtilmiştir.



Şekil 1. Faktör IX geni 5. Ekzonun baz dizileme çalışması

Tablo 1. Faktör IX geninin analizinde kullanılan primer dizileri

	Primer Po- zisyonu	Büyük- lüğü (bp)	Bağlanma ısıları °C
FIX 2.1 F/R	Promoter + ekzon 1	407	60
FIX 2.2 F/R	Ekzon 2 + 3	506	64
FIX 2.3 F/R	Ekzon 4	245	64
FIX 2.4 F/R	Ekzon 5	272	62
FIX 2.5F/R	Ekzon 6	458	57
FIX 2.6F/R	Ekzon 7	393	56
FIX 2.7F/R	Ekzon 8	394	51
FIX 2.8F/R	Ekzon 9	391	59
FIX 2.9F/R	Poly A	521	59



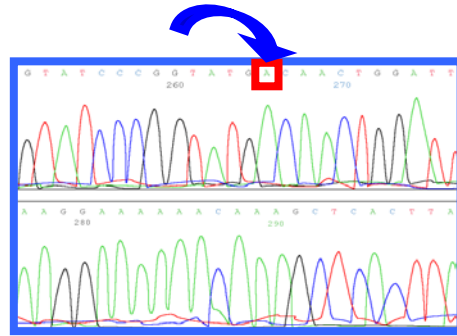
Şekil 2. HB6 hastasının faktör IX geni 5. ekzonunun dizisi

Tablo 3. Faktör IX geninde dizilenen DNA baz bölgeleri

Primer	Amplifiye edilen bölge
FIX2.1	Pozis.-124 / +282
FIX2.2	Pozis.6258 / 6771
FIX2.3	Pozis.10328 / 10563
FIX2.4	Pozis.17592 / 17866
FIX2.5	Pozis. 20238 / 20698
FIX2.6	Pozis. 29898 / 30293
FIX2.7	Pozis. 30709 / 31101
FIX2.8	Pozis. 31053 / 31449
FIX2.9	Pozis. 32410 / 32920

Tablo 2. FIX geni PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer dizileri

FIX 2.1 F	5' CCC ATT CTC TTC ACT TGT CC -3'
FIX 2.1 R	5' CCT AGC TAA CAA AGA ACC AGT -3'
FIX 2.2 F	5' AGA GAT GTA AAA TTT TCA TGA TGT T -3'
FIX 2.2 R	5' GCA GAG AAA AAA CCC ACA TAA T -3'
FIX 2.3 F	5' CTG CAG GGG AGG ACC GGG CAT TCT A -3'
FIX 2.3 R	5' GAA TTC AAC TTG TTT CAG AGG GAA -3'
FIX 2.4 F	5' CAT GAG TCA GTA GTT CCA TGT ACT TT -3'
FIX 2.4 R	5' TGT AGG TTT GTT AAA ATG CTG AAG TT -3'
FIX 2.5 F	5' TTT AAA TAC TGA TGG GCC TG -3'
FIX 2.5 R	5' GTT AGT GCT GAA ACT TGC CT -3'
FIX 2.6 F	5' AAG CTC ACA TTT CCA GAA AC 3'
FIX 2.6 R	5' T GG GTT CTG AAA TTA TGA -3'
FIX 2.7 F	5' TAA GAA TGA GAT CTT TAA CA -3'
FIX 2.7 R	5' CTA AGG TAC TGA AGA ACT AA -3'
FIX 2.8 F	5' GAA GAG TCT TCC ACA AAG GG -3'
FIX 2.8 R	5' AAG ATG GGA AAG TGA TTA GTT A -3'
FIX 2.9 F	5' AAG AGA ACC GTT CGT TTG CA -3'
FIX 2.9 R	5' AGA ACT AAA GGA ACT AGC AAG -3'



Şekil 3. Hasta HB1'de bulunan 31335. pozisyonundaki T >A Missens mutasyonunu gösteren şema

## SONUÇLAR

Bu çalışmada, Faktör IX geni tüm eksonları, promoter bölgesi ve poly A ucu mutasyonları açısından dizilenmiş ve görüntülenmiştir (Tablo 4). Bir hasta dışında diğer tüm vakalarda en az bir mutasyon belirlenmiştir. PCR ürünlerinin sekansıyla HB4 ve HB7 hastalarında promoter ve ekson 1 bölgelerinin parsiyel delesyonu gösterilmiştir. Ayrıca HB5 olgusunda ise ekson 7 delesyonu belirlenmiştir.

Diğer olgularda belirlenen mutasyonlar nonsens (2 olgu), insersiyon orjinli çerçeve kayması (1 olgu) ve missense (6 olgu) mutasyonlarından kaynaklanan tek baz mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlardan iki tanesi (30842. pozisyonundaki G ins (HB2) ve 30133. pozisyonundaki (HB10) T>C) yeni mutasyon olarak tanımlanmıştır (Tablo 5).

**Tablo 4.** Hemofili B hastalarında faktör IX geninde dizilemesi yapılabilen (+) bölgeler

DNA no.	Prom.+							
	1. Ekz	2+3. Ekz	4. Ekz	5. Ekz	6. Ekz	7. Ekz	8. Ekz	Poly A
HB1	+		+	+	+	+	+	+
HB2	+	-	+	+	+	+	+	+
HB3	+	+	+	+	+	+	+	+
HB6	+	+	+	+	+	+	+	+
HB8	+	+	+	+	+	+	+	+
HB9	+	+	+	+	+	+	+	+
HB10	+	-	+	+	+	+	+	+
HB11	+	+	+	+	+	+	+	+
HB12	+	+	+	+	+	+	+	+
HB13	+	-	+	+	+	+	+	+

**Tablo 5.** Hemofili B hastalarındaki klinik ve moleküler bulgular

DNA No	FIX : C(%)	Nükleotid Değişimi	Mutasyon Türü	Aminoasit Değişimi
HB1	5	31335 T > A	Missens	Val 405 Asp
HB2	2.2	30842 Gins (yeni)	İnsersiyon (frameshift)	Thr 241 Asp
HB3	< 1.5	20551 C > T	Nonsens	Gln 191 Stop
HB4	3.7	Prom+1.ekzon Del.		
HB5	4	7.ekzon Delesyonu		
HB6		17719 A > T	Missens	Ser 102 Cys
HB7		Prom+1.ekzon Del.		
HB8	3	31118 C > T	Nonsens	Arg 333 Stop
HB9		6392 T > C	Missens	Leu 6 ser
HB10	10.5	30133 T > C (yeni)	Missens	Val 227 Ala
HB11		31119 G > A	Missens	Arg 333 Gln
HB12	> % 50			
HB13		30150 G > A	Missens	Ala 233 Thr

Mutasyonlar arasında, T>A 8. eksonun 31.335 pozisyonunda transversiyon tipi mutasyon HB1 protokol numaralı hemofilili olguda bulunmuştur (Şekil 3). Bu mutasyon valin aminoasidini asp'ye ceviren missens mutasyondur. Serimizde bulunan diğer missens mutasyonlar, HB 6 olgusunda 5. eksonun 17719. pozisyonundaki A>T transversiyon tipi mutasyon ile ser102cys değişimi, FIX:C(%)<1.5 olan HB 9 olgusunda 2. eksonun 6392. pozisyonundaki T>C transisyon tipi mutasyon ile leu6ser değişimi, HB11 olgusunda 8. eksonun 31119. pozisyonundaki G>A transisyonel mutasyon ile Arg333Gln değişimi ve HB13 olgusunda da 7. eksonun 30150. pozisyonundaki G>A transisyonel mutasyon ile Ala233Thr değişimi şeklindedir.

HB10 hastasında 30133. pozisyonunda tespit edilen T>C transisyonu, yapılan internet taramaları ve hemofili B veri tabanına göre bu pozisyonunda ortaya konan ilk mutasyondur. Val 227 rezidüsü meydana gelen değişim sonucunda Ala'ya dönüşmüştür.

Diğer yeni mutasyon HB2 olgusunda tanımlanmıştır. HB2'de 8. eksonun 30842. pozisyonunda insersiyon tipi mutasyon saptanmıştır. Thr 241 rezidüsü G bazı insersiyonu ile Asp amino asitine

dönüşmüş, çerçeve kayması mutasyonu nedeniyle amino asit dizi değişikliği meydana gelmiştir. Nonsens mutasyonların gözlemlendiği ilk olguda (HB2 FIX; C<1.5%) 20551 C>T değişimi prematür dur kodonu (Gln191Dur) oluştururken, diğer olguda (HB8 FIX; C<3%) prematür dur kodonu oluşumu 31118. pozisyonundaki C>T değişimi (Arg333) nedeniyle oluşmuştur.

## TARTIŞMA

HB, FIX'u kodlayan tüm genin dizisinde izlenebilen bir dizi mutasyon sonucu oluşur ve kodlanan proteinin çoklu fonksiyonel domainlerinin bulunması, hücre içi natürasyon sürecinin karmaşık olduğunu göstermektedir. Hastalığın klinik şiddeti, Xq27.1'de yer alan faktör IX genindeki mutasyonun yeri ve yapısı ile yakından ilişkilidir. Normal dizinin tesbitinden sonra (17), 2300'den fazla farklı mutasyon gösteren 2511 HB mutasyonu bildirilmiştir (<http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/intro.html>). HB rapor ve veri tabanları hastalığın yüksek derecede moleküler heterojeniteye sahip olduğunu açıkça göstermektedir ve bu kadar yüksek derecede

moleküler heterojenite hemen hemen her hastanın en az bir özel mutasyon paterni olduğuna işaret etmektedir.

Genomik DNA'nın amplifikasyonu için metodların ve polimeraz zincir reaksiyonunu temel alan tarama tekniklerinin gelişimi; etkilenmiş pedigrilerde moleküler hasarların direkt taranmasını büyük ölçüde hızlandırmıştır. Bu stratejiler PCR amplifikasyonu, yanlış eşleşme taraması (AMD) (18,19), heterodupleks analizler ya da kimyasal yanlış eşleşme yarıklanması (20) ve tek zincir konformasyon polimorfizmidir (SSCP) (21-23). Total ve kısmi delesyonlar PCR amplifikasyonu sonrası gerçekleştirilen konvansiyonel akrilamid jelde PCR reaksiyonunun analizi ile çok kısa zamanda ve kolayca tanımlanabilmektedir. Bu çalışmada, iki olguda (HB4 ve HB7) promotor ve 1. ekzon delesyonları ve HB5 olgusunda ekzon 8 delesyonu, PCR reaksiyonları ile kolayca tanımlanabilmiştir.

Faktör IX genindeki mutasyonların taranmasında kullanılan tekniklerden biri olan, SSCP tekniği geniş çapta kullanılan stratejilerden biri olmakla birlikte HB mutasyon tanısındaki duyarlılığı ancak %90'a ulaşabilmiştir (22). Buna karşın, her HB olgusunun en azından bir mutasyona sahip olması ve mutasyonların çok çeşitli lokalizasyonlarda bulunması tarama tekniklerinin duyarlılığının olabildiğince yüksek olmasını zorunlu kılmaktadır.

DNA dizileme yöntemi referans bir metod olarak kabul ediliyorsa da, çoğaltılan DNA'nın direkt dizilenmesi bir gendeki mutasyonların rutin olarak taranmasında yakın zamana kadar kullanılmamıştır. Manual dizi analizinin pahalı olması, zaman kaybı yaratması ve yoğun laboratuvar işlemleri gerektirmesi nedeniyle yöntemin heterojenite gösteren genlerdeki mutasyon belirleme amaçlı kullanımını zorlaştırmıştır. Ancak diğer tarama metodları da yoğun laboratuvar iş gücü gerektirmekte ve zaman almaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin mutasyon tarama oranı oldukça düşüktür ve asla %100'e ulaşmaktadır. Günümüzde sekans reaksiyonları tamamen otomatize edilmiş bir kapiler elektroforezi tarafından yapıldığından yöntem basitleşmiş, zaman kaybı ve kişisel hatalar asgari düzeye indirgenmiştir ve böylece otomatik DNA dizileme cihazları kullanılarak dizi analizi daha çok kullanılabilir hale gelmiştir. Diğer taraftan Faktör IX geninin sadece sekiz eksonlu olması ve en büyük eksonunun 2kb uzunluğunda olması da bu gene ilişkin mutasyon taramalarında DNA dizileme analizinin kullanılabilirliğini destekler niteliktedir.

Faktör IX geni promotörü içindeki belli mutasyonlar promotörde DNA-protein etkileşimini bozmakta ya da yok etmekte ve böylece transkripsiyon

verimini tehlikeye atmaktadır. Faktör IX geni delesyonları tüm gen delesyonlarını, 5' ya da 3' uçlarındaki kısmi gen delesyonlarını ve birden çok baz çiftine kadar olan mikrodelesyonları kapsamaktadır. Bu çalışmada, üç olguda faktör IX geninde bulunan büyük delesyonlar indirekt DNA yöntemiyle tespit edilmiştir. Büyük delesyonlu tüm hastalar şiddetli HB fenotipleri göstermektedirler. Diğer mutasyonlar yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlardır. En sıklıkla görülen mutasyon yanlış anlamlı mutasyondur ve faktör IX gen aktivitesinde bozulmalarla sonuçlanan aminoasit iskeletinde değişime neden olmaktadır. Nonsens mutasyonlar ile ağır HB fenotipi arasındaki bağlantı da çalışmamızdaki iki olguda doğrulanmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları direkt nükleotid dizilemesi stratejisinin basit, hızlı, etkili olduğunu ve HB mutasyon taramasında maksimum duyarlılık gösterdiğini öne sürmemize olanak tanımaktadır. Mutasyonların dağılımı faktör IX geninin tüm bölgelerinin hastalıkta etkili olabileceğini ve bu yüzden taramanın en yüksek doğruluk oranıyla tüm gende uygulanmasının gerekliliğini destekler niteliktedir.

## KAYNAKLAR

1. Biggs R, Spooner RJD: National survey of haemophilia and Christmas disease patients in the United Kingdom. *Lancet*, 1978; 1: 1143.
2. Fraser BM, Poon MC, Hoar DI: Identification of factor IX mutations in haemophilia B: application of polymerase chain reaction and single strand conformation analysis. *Hum Genet*, 1992; 88: 426-430.
3. Giannelli F, Green PM, High KA, Sommer S, Poon MC, Ludwig M, Schwaab R, Reitsma PH, Goossens M, Yoshioka A, Brownlee GG: Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions fourth edition. *Nucleic acids: Research*, 1993; 13: 3075-3087.
4. Martinez PA, Romey MC, Schued JF, Gris JC, Demaille J, Claustres M: Factor IX gene mutations causing haemophilia B: comparison of SSC screening versus systematic DNA sequencing and diagnostic application. *Hum Genet*, 1994; 94: 287-290.
5. Vivian CP, Lau AP, Chan TK: A novel haemophilia B defect due to partial duplication of the factor IX gene. *British Journal of haematology*, Hong Kong, 1994; 86: 601-609.
6. Weikuan G, Marjory B, James C, Jharna R, Kunal R: Distinct Mutations Cause Severe Haemophilia B in Two Unrelated Canine Pedigrees. *Thromb Haemost*, 1999; 82: 1270-1275.

7. Green PM, Bentley DR, Miboihon RS, Nilsson IM, Giannelli F: Molecular pathology of haemophilia B. *The EMBO Journal*, 1989; 4: 1067-1072.
8. Green PM, Montandon AJ, Bentley DR, Gianelli F: Genetics and Molecular Biology of Hemophilias A and B. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1991; 2: 539-565.
9. Limentoni SA, Furie BC, Frie B: *The Biochemistry of factor IX. Hemostasis and Thrombosis*, JB. Lippincott Company, Philadelphia, 1994.
10. Bowen DJ: Haemophilia A and haemophilia B: Molecular insights.
11. Knöll A, Ketterling RP, Sommer SS: Absence of somatic mosaicism in 17 families with haemophilia B: an analysis with a sensitivity 10-to 1000- fold greater than that of sequencing gel. *Hum Genet*, 1996; 98: 539-545.
12. Attali O, Vinciguerra C, Trzeciak MC, Durin A, Pernod G, Gay V, Menart C, Sobas F, Dechavanne M, Negtler C: Factor IX gene Analysis in 70 Unrelated Patient with Haemophilia B: Description of 13 New Mutation. *Thromb Haemost*, 1999; 82: 1437-42.
13. Costa JM, Ernault P, Vidaud D, Vidaud M, Meyer D, Laveigne JM: Fast and Efficient Mutation Detection Method Using Multiplex PCR and Cycle Sequencing. *Thromb Haemost*, 2000; 83: 244-247.
14. <http://www.uwds.ac.uk/molgen>  
<http://www.umds.ac.uk/molgen>
15. Poon MC, Anand S, Fraser BM Hoar DI, Sinclair GD: Haemophilia B carrier determination based on family specific mutation detection by DNA single strand conformation analysis. *J Lab Clin Med*, 1993; 55-62.
16. Solak M, Bağcı H, Şengil AZ, Öztaş S: Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA teknolojisi (Temel bilgiler). Afyon Kocatepe Üniversitesi, Ankara, 2000; 124-137.
17. Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K: Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (Antihemophilic factor B). *Biochemistry.*, 1985; 24(14): 3736-50.
18. Driscoll M.C, Chu A, Hilgartner MW: Heteroduplex analysis in hemophilia B, detection of two novel factor IX gene mutations. *Am J Hematol*, 1996; 51(4):324-7.
19. Montandon AJ, Green PM, Bentley DR, Ljung R, Kling S, Nilsson I M, Gianelli F: Direct estimate of hemophilia B ( factor IX deficiency ) mutation rate and of the ratio of the sex-specific mutation rates in Sweden . *Hum Genet*, 1992; 89(3):319-22.
20. Haris II, Green PM, Bentley DR, Gianelli F: Mutation detection by fluorescent chemical cleavage. Application to haemophilia B. *PCR methods Appl*, 1994; 3(5):268-71.
21. Aquilar-Martinez P, Romes MC, Schued JF, Gris JC, Demaille J, Claustres M: Haemophilia B: Comparison of SSC screening versus systematic DNA sequencing on a diagnostic applications. *Hum Genet*, 1994; 94(3):287-90.
22. Montejo JM, Magallon M, Tizzano F, Solera S: Identification of twenty-one new mutations in the factor IX gene by SSCP analysis. *Hum Mutat*, 1999; 13(2):160-5.
23. Nielsen LR, Scheibel E, Ingwerslev J, Schwartz M: Detection of ten new mutations by screening the gene encoding factor IX of Danish Haemophilia B patients. *Thromb Haemost*, 1995; 73(5): 774-8.