

# **Análisis molecular del gen F8 de la coagulación: Identificación de marcadores polimórficos y mutaciones en pacientes españoles con hemofilia A.**

Adoración Venceslá García

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *F8* DE LA  
COAGULACIÓN: IDENTIFICACIÓN DE  
MARCADORES POLIMÓRFICOS Y  
MUTACIONES EN PACIENTES ESPAÑOLES  
CON HEMOFILIA A.

ADORACIÓN VENCESLÁ GARCÍA

2009

Tesis Doctoral

Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i

Neurociències

Universitat de Barcelona.



# ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *F8* DE LA COAGULACIÓN: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES POLIMÓRFICOS Y MUTACIONES EN PACIENTES ESPAÑOLES CON HEMOFILIA A.

Memoria presentada por Adoración Venceslá García para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Eduardo Tizzano Ferrari, en la Unidad de Genética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y está vinculada al departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències de la Universitat de Barcelona, bajo la tutela del Dr. Carles Enrich Bastús.

Programa Biologia i Patologia Cel·lulars, Universitat de Barcelona  
(Bienio 2004-2006)

Adoración Venceslá García

Dr. Eduardo Tizzano Ferrari  
Director de tesis

Carles Enrich Bastús  
Tutor de tesis

Barcelona, Diciembre 2009



**A mi padre,**

El hombre más incondicional de mi vida

Porque tendrías que estar aquí.

Y a mi madre y a Alejandro

Y viceversa.



***“En el punto donde se detiene la ciencia, empieza la imaginación”***

Jules de Gaultier

(1858-1942) Filósofo Francés





**AGRADECIMIENTOS**



Son muchas las personas que han hecho posible con su colaboración y apoyo científico y personal que hoy estéis leyendo mi trabajo de tesis. Por eso, llegado este momento, no quiero pasar por alto la posibilidad de agradecerles públicamente la ayuda prestada.

En primer lugar y ante todo, quiero agradecer a los pacientes con hemofilia y sus familiares, la posibilidad que me han brindado para profundizar y avanzar en el conocimiento de la enfermedad, participando en los estudios que he llevado a cabo en este trabajo de tesis. Así mismo, mi agradecimiento a la Associació Catalana d`Hemofília, a la Fundació privada Catalana de l`Hemofília, a la Real fundación Victoria Eugenia, y a los laboratorios Wyeth por su aportación económica sin la cual, esto no hubiera sido posible.

Al Dr. Eduardo Tizzano, director de esta tesis, por su confianza, su paciencia, por enseñarme que la ciencia se hace paso a paso, por los momentos tan buenos y otros no tanto que hemos compartido, por enseñarme que “*el coso*” no es solo una frase, lo es TODO, gracias.

A la Dra. Baiget, responsable del servicio de Genética del Hospital de la Santa Creu y Sant Pau por aceptarme en su servicio y permitirme emprender esta gran aventura, que ha sido mi tesis.

A mi Maneleitor compañero infatigable, gracias por compartir conmigo alegrías y desánimos, gracias por aguantar con resignación mis días duros. Gracias por hacerme creer que juego bien al squash.

A todos mis compañeros del laboratorio de genética, Sara Bernal, Laura, María Jesús, Eva, Rebeca, Jonás, Lidia González, Meriyon (María José), Pía, Mónica Cornet, Montse Domenech, Montse Boltes, a las chicas de farmacogenética: Eli, Laia, Juliana, y a los que estuvieron: Sara Gutiérrez, Laura de Jorge, Alba, Lidia Caselles, Mónica Calaf, Loreto, Lidia Sedano, Berta y Orland, gracias a todos por vuestros consejos, por vuestra ayuda, por escucharme, por estar ahí compartiendo conmigo tanto los momentos alegres como los difíciles.

Gracias al Dr. Pablo Fuentes-Prior, por adentrarme en el maravilloso mundo de la estructura de las proteínas, gracias por darle sentido a mis cuatro años de búsqueda de mutaciones, por la aportación de tu conocimiento y entusiasmo en algunos de los trabajos realizados en esta tesis, gracias por tu ayuda incondicional, gracias por las tan divertidas discusiones científicas que hemos tenido, por todo eso y por más, gracias.

Gracias a las labo-girls, mis nenas del clínic, que buenos momentos hemos pasado durante y después de mi paso por el laboratorio de medicina interna, quien me iba a decir que después de irme, seguiríais formando parte de mi vida.

Gracias a todas aquellas personas que me habéis servido de inspiración y ejemplo por vuestra constancia en el trabajo.

Gracias a todos los que habéis confiado en mi, los que siempre habéis estado cuando me ganaba la desilusión.

Gracias a mi familia, a mi madre por su ayuda, por venirse conmigo sin pensárselo para que pudiera escribir esta tesis, porque siempre he podido contar con ellos sin condiciones, sin reproches, a mi hermana por sus palabras de aliento, por su cariño, por hacerme sentir lo orgullosa que está de mi.

A Alejandro, porque me ha hecho ser más luchadora si cabe, por todos los momentos de amor y cariño que me ha regalado, por el respeto que siempre ha demostrado ante mis decisiones no siempre compartidas. Gracias por estar a mi lado y por atreverte a hacer este fantástico viaje de la vida junto a mí.

Por último, quiero dedicarles unas palabras a mis pequeñajos, Alejandra y Javier. Vosotros no lo sabéis pero ya erais una realidad cuando este libro solo era un proyecto, y habéis formado parte de él desde el principio, así que, mi esfuerzo y mi sacrificio ha sido también el vuestro. Os quiero.

# INDICE

<b>I.</b>	<b>GLOSARIO Y ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>1.</b>	<b>Hemostasia.....</b>	<b>13</b>
1.1	El Endotelio .....	13
1.2	Las Plaquetas .....	14
1.3	La Cascada de la Coagulación .....	15
1.3.1.	Vía Extrínseca .....	17
1.3.2.	Vía Intrínseca .....	17
1.3.3.	Vía Común .....	18
1.3.4.	Inhibición de la Cascada de la Coagulación .....	19
1.4	Nuevo Modelo Celular de la Coagulación.....	21
1.5	La Fibrinólisis .....	23
<b>2.</b>	<b>La Hemofilia.....</b>	<b>24</b>
2.1	Antecedentes Históricos de la Hemofilia.....	24
2.2	Manifestaciones Clínicas .....	25
2.2.1.	Diagnóstico Clínico.....	26
2.3	Desarrollo de Inhibidores .....	27
2.4	Tratamiento Actual .....	30
2.4.1.	Concentrados de Factor VIII .....	30
2.4.2.	Otros Fármacos.....	31
2.4.3.	Tratamiento a Pacientes que han desarrollado Inhibidor.....	33
2.5	Nuevas Perspectivas Terapéuticas.....	34
2.6	Herencia.....	35
<b>3.</b>	<b>Factor VIII (F8).....</b>	<b>36</b>
3.1	Gen del <i>F8</i> .....	36
3.2	Estructura del Factor VIII .....	37
3.3	Biosíntesis del Factor VIII .....	39

3.4	Modificaciones Postraduccionales .....	39
3.5	Activación e Inactivación del FVIII.....	40
3.6	Interacción con los componentes de la vía intrínseca de la coagulación.....	41
<b>4.</b>	<b>Análisis molecular.....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>Asesoramiento genético y opciones reproductivas.....</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>La hemofilia B y la enfermedad de von Willebrand.....</b>	<b>44</b>
6.1	Hemofilia B o déficit de Factor IX (FIX).....	45
6.2	Enfermedad de von Willebrand (vWD).....	46
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>47</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS CONCRETOS .....</b>	<b>51</b>
<b>V.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
<b>1.</b>	<b>ESTUDIO INDIRECTO CON MARCADORES:.....</b>	<b>57</b>
1.1	Extragenéticos.....	59
1.2	Intragenéticos.....	59
<b>2.</b>	<b>ESTUDIO DIRECTO .....</b>	<b>61</b>
2.1	Inversión del intron 22.....	61
2.2	Inversión del Intron 1.....	62
2.3	Determinación de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o inserciones. . .....	62
2.4	Confirmación que los cambios encontrados de un aminoácido por otro son patológicos. ....	66
2.5	Detección de grandes deleciones o duplicaciones mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real ( <i>Quantitative Real time polymerase Chain Reaction</i> )... .....	67
2.6	Detección de grandes deleciones o duplicaciones mediante la técnica de MLPA ( <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> ) .....	69
2.6.1.	Lectura del ADN .....	71

**VI. RESULTADOS.....75**

**1. DESCUBRIMIENTOS DE NUEVOS MARCADORES EN EL GEN F8 DE LA COAGULACIÓN.....77**

**1.1** Tizzano E, Venceslá A, Cornet M, Baena M, Baiget M. "Utility of a (GT) dinucleotide repeat in intron 1 of the factor 8 gene for haemophilia A carrier diagnosis". *Haemophilia*. 2005 Mar;11 (2):142-4.

**1.2** Venceslá A, Baena M, Fares Taie L, Cornet M, Baiget M, Tizzano EF."Application of intron 9 and intron 25 dinucleotide repeats of the factor VIII gene for carrier diagnosis in haemophilia A". *Haemophilia*. 2008 May;14 (3):489-93.

**2. IDENTIFICAR Y CARACTERIZAR LA PATOLOGÍA MOLECULAR DE PACIENTES ESPAÑOLES CON HEMOFILIA A. ....93**

**2.1** Tizzano EF, Venceslá A, Baena M, Cornet M, Calvo MT, Lucía JF, Pérez Garrido R, Núñez R, Baiget M. "First report of two independent point factorVIII mutations in a family with haemophilia a: a word of caution for carrier diagnosis". *Thromb Haemost.* 2005 Sep;94(3):675-7.

**2.2** Venceslá A, Corral-Rodríguez MA, Baena M, Cornet M, Domènech M, Baiget M, Fuentes-Prior P, Tizzano EF. "Identification of 31 novel mutations in the F8 gene in Spanish hemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites". *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3468-78.

**3. VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS EN CASOS ESPECIALES CON HEMOFILIA A. ....119**

**3.1** Tizzano EF, Barceló MJ, Baena M, Cornet M, Venceslá A, Mateo J, Fontcuberta J, Baiget M. "Rapid identification of female haemophilia A carriers with deletions in the factor VIII gene by quantitative real-time PCR analysis". *Thromb Haemost.* 2005 Sep;94(3):661-4.



**3.2** Venceslá A, Barceló MJ, Baena M, Quintana M, Baiget M, Tizzano EF. “Marker and real-time quantitative analyses to confirm hemophilia B carrier diagnosis of a complete deletion of the F9 gene”. *Haematologica*. 2007 Nov;92(11):1583-4.

**3.3** A Venceslá, M Baena, R Pérez Garrido, R Núñez, F Velasco, J Rosell, M Baiget and E F. Tizzano. “Application of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis to unmask molecular pathology of the F8 gene in atypical HA cases”. *manuscrito en preparación*.

<b>VII. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>153</b>
<b>1. Identificación de nuevos marcadores en el gen F8 de la coagulación.....</b>	<b>155</b>
<b>2. Identificación y caracterización de la patología molecular en pacientes con HA.....</b>	<b>159</b>
<b>3. Validación y aplicación de nuevas técnicas de estudio molecular en casos especiales con hemofilia A.....</b>	<b>164</b>
3.1 Pacientes sin mutación detectable.....	164
3.2 Mujeres portadoras de una deleción.....	166
3.3 Mujeres afectadas con hemofilia.....	167
3.4 Validación de los métodos de cuantificación de dosis génica para el estudio del F8 y F9.....	168
3.5 Algoritmo de diagnóstico molecular de la hemofilia A.....	169
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>173</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>177</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>197</b>

## **I. GLOSARIO Y ABREVIATURAS**



**ADN:** Acido desoxirribonucleico.

**ADP:** Adenosina-5`-difosfato.

**AHA** Hemofilia A adquirida.

**APC:** Proteína C activada.

**APCC:** Concentrado de Complejo Protrombínico Activado.

**APTT:** Tiempo de tromboplastina parcial activada.

**AR:** Receptor de Andrógenos.

**AT:** Antitrombina.

**bp:** Pares de bases.

**centiMorgan (cM):** Es la unidad para medir distancias en un mapa genético. Se define como la longitud de un intervalo en el cual hay un 1% de probabilidades de recombinación entre dos *locis* en la meiosis. Tiene un valor aproximado de un millón de pares de bases.

**Chaperona:** Son un conjunto de proteínas que están presentes en todas las células, cuya función es ayudar al plegamiento de otras proteínas que se acaban de formar, también ayudan al ensamblaje y al transporte celular de dichas proteínas a otra parte de la célula donde realiza su función.

**Coefficiente de Extinción Molar:** Representa a cada longitud de onda la capacidad que tienen una sustancia de absorber la radiación electromagnética.

$$e = A / c l$$

donde, A= absorbancia; c= concentración molar del soluto; l= longitud de la cubeta.

**Cp:** *Crossing point.*

**Da:** Dalton o Unidad de masa atómica. Equivale a la duodécima parte de la masa de un átomo de carbono-12.

**DDAVP:** Desmopresina.

**ddNTP:** 2'3'-dideoxynucleótido trifosfatados. Un tipo de nucleótidos que carece de su grupo hidroxilo en el extremo 3', esto provoca que ningún otro nucleótido pueda unirse a este extremo, interrumpiéndose la polimerización de la cadena de ADN.

**Diátesis Hemorrágica:** Condición del organismo congénita o adquirida que predispone a sangrar de forma anómala debido a una alteración en el mecanismo fisiológico de la hemostasia.

**DO:** Densidad óptica.

**DGP:** Diagnóstico Genético Preimplantacional.

**FIIa:** Trombina.

- FV:** Factor V.
- FVII:** Factor VII.
- FVIII:** Factor VIII.
- FIX:** Factor IX.
- FX:** Factor X.
- FXI:** Factor XI.
- FXII:** Factor XII.
- FXIII:** Factor XIII.
- F8:** Referente al gen del FVIII.
- HA:** Hemofilia A.
- HAMSTeRS:** Base de datos de la Hemofilia A. <http://europium.csc.mrc.ac.uk>
- Haplotipo:** Combinación de alelos ligados a múltiples *loci* que se transmiten juntos.
- HB:** Hemofilia B.
- Hemartrosis:** Acumulación de sangre extravasada en una articulación o en su cavidad sinovial.
- HMWK:** Kininógeno de alto peso molecular (*High Molecular Weight Kininogen*).
- I-PCR:** PCR Inversa. Es una variante de PCR que se emplea para amplificar regiones desconocidas de ADN, situadas en posición vecina a secuencias diana conocidas. En lugar de amplificar la región interna flanqueada por los dos cebadores, amplifica la región externa, que flanquea a los cebadores. Para ello es necesario cortar el ADN con una enzima de restricción, de tal forma, que los extremos cohesivos resultantes puedan hibridar entre sí, formando una molécula circular. Esta se une por una ligasa y se realiza la PCR.
- Isotipo:** Cada uno de los cinco tipos de anticuerpos, determinados por la forma de la cadena pesada que contenga. Los isotipos de anticuerpos son IgM, IgD, IgG, IgA e IgE y cada isotipo realiza un conjunto diferente de funciones efectoras.
- ITT:** Tratamiento de Inmunotolerancia.
- Locus** (Plural *loci*): Es una posición fija sobre un cromosoma, como puede ser la posición de un gen o de un marcador.
- Marcador:** Polimorfismo genético (SNP, microsatélites...) localizado en una zona cromosómica conocida. La herencia de dicho marcador puede ser controlada en una serie de individuos relacionados en familias y nos permite rastrear los genes mutados dentro de familias afectadas.
- MHC:** Complejo Principal de Histocompatibilidad.
- MLPA:** *Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification*.
- NO:** Oxido nítrico.

- PAF:** Factores activadores de las plaquetas.
- PAI-1:** Inhibidor del activador del plasminógeno tipo I.
- PC:** Proteína C.
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- Plasmaféresis:** Es un método por el cual se extrae completamente la sangre del cuerpo de un paciente o donador y se procesa de forma que los glóbulos blancos, rojos y plaquetas se separan del plasma. Las células de la sangre se devuelven al paciente o donante sin plasma, el organismo lo reemplaza rápidamente.
- Polimorfismo:** Variaciones naturales en la secuencia de ADN que se producen con una frecuencia superior al 1.1% en la población estudiada. La mayoría de los polimorfismos contribuye a la variación normal entre los individuos.
- Primers:** Conocido también como cebador. Son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región complementaria al ADN molde que se desea amplificar y propician el inicio de la reacción de elongación por la *Taq* DNA polimerasa. Son los iniciadores de la PCR.
- PS:** Proteína S.
- PT:** Protrombina.
- Respuesta Anamnésica:** conocida también como respuesta inmunitaria secundaria, es una respuesta de inmunidad adaptativa que se produce por la segunda exposición a un antígeno. Se caracteriza por una cinética más rápida y por una mayor intensidad comparada con la respuesta inmune primaria, además se lleva a cabo primeramente con IgG.
- rFVIIa:** Factor VII recombinante activado.
- TAFI:** Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina.
- TFPI:** Inhibidor de la vía del factor tisular.
- TG:** Terapia Génica.
- Tm:** Temperatura de *melting*. Es la temperatura a la cual el 50% de ADN está en forma de cadena simple y el otro 50% de cadena doble. Esta temperatura es propia de cada fragmento de ADN y depende del tamaño del fragmento que se amplifica y de la proporción de guaninas-citosinas que presenta.
- TM:** Trombomodulina.
- Tolerancia:** Ausencia de respuesta del sistema inmunitario frente a un antígeno ya sea propio o extraño, inducida por el contacto previo con dicho antígeno. Se trata de un estado activo, no es una simple falta de respuesta, dotado de especificidad y memoria. Es un estado adquirido no innato que se induce más

fácilmente en linfocitos inmaduros, cuando no hay señal coestimuladora y requiere que el antígeno persista para que dicho estado permanezca.

- t-PA:** Activador tisular del plasminógeno.
- UB:** Unidades Bethesda.
- UI:** Unidad Internacional. Es una unidad de medida de la cantidad de una sustancia, basada en su actividad biológica mediada (o sus efectos). Su valor difiere de una sustancia a otra y es establecida por acuerdo internacional.
- u-PA:** Activador del plasminógeno tipo urokinasa.
- VNTR:** Repeticiones en tandem de número variable (*Variable number tandem repeat*) también llamados minisatélites. Es un ADN moderadamente repetitivo de 10 a 24 pb que se organiza en bloques dispersos de repeticiones en tándem, que suelen encontrarse en puntos concretos del cromosoma, principalmente centrómeros y telómeros. Son zonas hipervariables debido a que su número de repeticiones varía ampliamente en los diferentes individuos.
- vWD:** Enfermedad de von Willebrand
- vWF:** Factor von Willebrand.
- Xasa:** Complejo Tenasa (FVIIIa·FIXa).

## **II. INTRODUCCIÓN**





## 1. Hemostasia

La hemostasia es la capacidad que tiene un organismo para mantener la sangre fluida dentro de la circulación en condiciones fisiológicas. Cuando una lesión afecta la integridad de las paredes de los vasos sanguíneos se ponen en marcha una serie de mecanismos que tienden a limitar la pérdida de sangre. Estos mecanismos comprenden la vasoconstricción local del vaso, el depósito y agregación de las plaquetas y la coagulación de la sangre con la formación de un trombo hasta que se repara el daño; una vez reparado se procede a la disolución de dicho trombo (fibrinólisis).

Para una correcta hemostasia es necesario que haya un equilibrio entre los factores procoagulantes que forman parte de la cascada de la coagulación y favorecen la formación del trombo, y los factores anticoagulantes y fibrinolíticos que son los encargados de deshacer dicho trombo y restituir el flujo normal de la sangre. Los elementos responsables de la correcta regulación de la hemostasia son: el endotelio, las plaquetas y los factores solubles de la coagulación (Blann y Lip, 2001).

Se distinguen tres fases en el proceso de la hemostasia, (a) una **fase vascular** en la que se produce una vasoconstricción local para reducir el flujo sanguíneo en la zona dañada, seguida de (b) una **fase plaquetaria** o **hemostasia primaria**, en la cual las plaquetas son esenciales. El proceso consiste de interacciones complejas entre la pared del vaso dañado, las plaquetas y las proteínas adhesivas, dando lugar a un agregado plaquetario en el endotelio lesionado. Y por último, (c) la **hemostasia secundaria**, comúnmente llamada coagulación, que consiste básicamente en la formación de un polímero de fibrina que estabiliza el tapón plaquetario inicial, mediante la activación de la cascada de la coagulación (Baumgartner, 1973).

### 1.1 El Endotelio

El endotelio constituye uno de los primeros reguladores de la hemostasia, controlando el intercambio entre las moléculas de la sangre y el tejido extravascular, jugando un papel activo en la permeabilidad del vaso (Cines *et al* 1998). En condiciones normales, las células del endotelio son activamente antitrombóticas; estas propiedades se pierden o se modifican cuando el endotelio se estimula o se lesiona. Cuando se produce un daño en el endotelio queda al descubierto la capa subendotelial que contiene componentes altamente trombogénicos, tales como el colágeno, el Factor von Willebrand (vWF) y otras moléculas implicadas en la adhesión plaquetaria. Las plaquetas se unen al subendotelio a través de

interacciones entre glicoproteínas de membrana, principalmente la GP-Ib, con las proteínas subendoteliales: el vWF, el colágeno, la fibronectina, y la vitronectina.

La capa más externa de la membrana endotelial presenta fosfolípidos neutros, los cuales no permiten la unión de factores de la cascada de coagulación, y glucosaminoglucanos cargados negativamente como el sulfato de heparán (Esmon y Owen, 1981); estos últimos regulan negativamente la cascada (ver más abajo). Las células endoteliales sintetizan y secretan al torrente sanguíneo inhibidores de la adhesión, activación, secreción y agregación plaquetaria como el óxido nítrico (NO), las prostaglandinas PGI<sub>2</sub> que actúan sinérgicamente con el NO (Stamler et al 1989), y la ectoADPase que degrada las moléculas de adenosina-5'-difosfato (ADP), un agonista de la activación de las plaquetas (Marcus *et al* 1997). Además, el endotelio mantiene la fluidez de la sangre gracias a la producción de moléculas que directa (ej.: el inhibidor de la vía del factor tisular, TFPI; (Broze et al 1995)) o indirectamente interfieren con la cascada de coagulación, como son la trombosmodulina (TM) y la proteína S (PS) (Fair *et al* 1986). Finalmente, el endotelio desarrolla su función de activador de la fibrinólisis mediante la síntesis y secreción de activadores fibrinolíticos como el activador tisular del plasminógeno (t-PA), y al activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) (Hajjar y Hamel 1990).

Por otra parte, cuando las células endoteliales son activadas por la trombina (FIIa) o por citoquinas inflamatorias, hipoxia o endotoxinas, adquieren propiedades protrombóticas, caracterizadas por la exposición de fosfolípidos aniónicos en la parte externa de sus membranas, algo que también ocurre en las plaquetas activadas. Estos fosfolípidos cargados negativamente actúan como receptores de los factores de la coagulación, como el factor IX activado (FIXa) y su cofactor, el factor VIII activado (FVIIIa).

## 1.2 Las Plaquetas

Las plaquetas son células sin núcleo que se originan por la fragmentación de megacariocitos precursores (Schulez y Shivdasani 2005). Los fosfolípidos de las plaquetas juegan papeles funcionales muy importantes, tanto como segundos mensajeros como en su condición de receptores de factores procoagulantes. La estructura citoesquelética de las plaquetas permite notables cambios de forma después de su activación, así como la liberación de los contenidos de los gránulos (principalmente factores procoagulantes y antifibrinolíticos). Las plaquetas activadas forman grandes agregados que culminan la hemostasia primaria (Baumgartner, 1973).

Las plaquetas circulan por la sangre como centinelas de la integridad vascular que no interactúan con la pared del vaso en condiciones normales, pero se adhieren

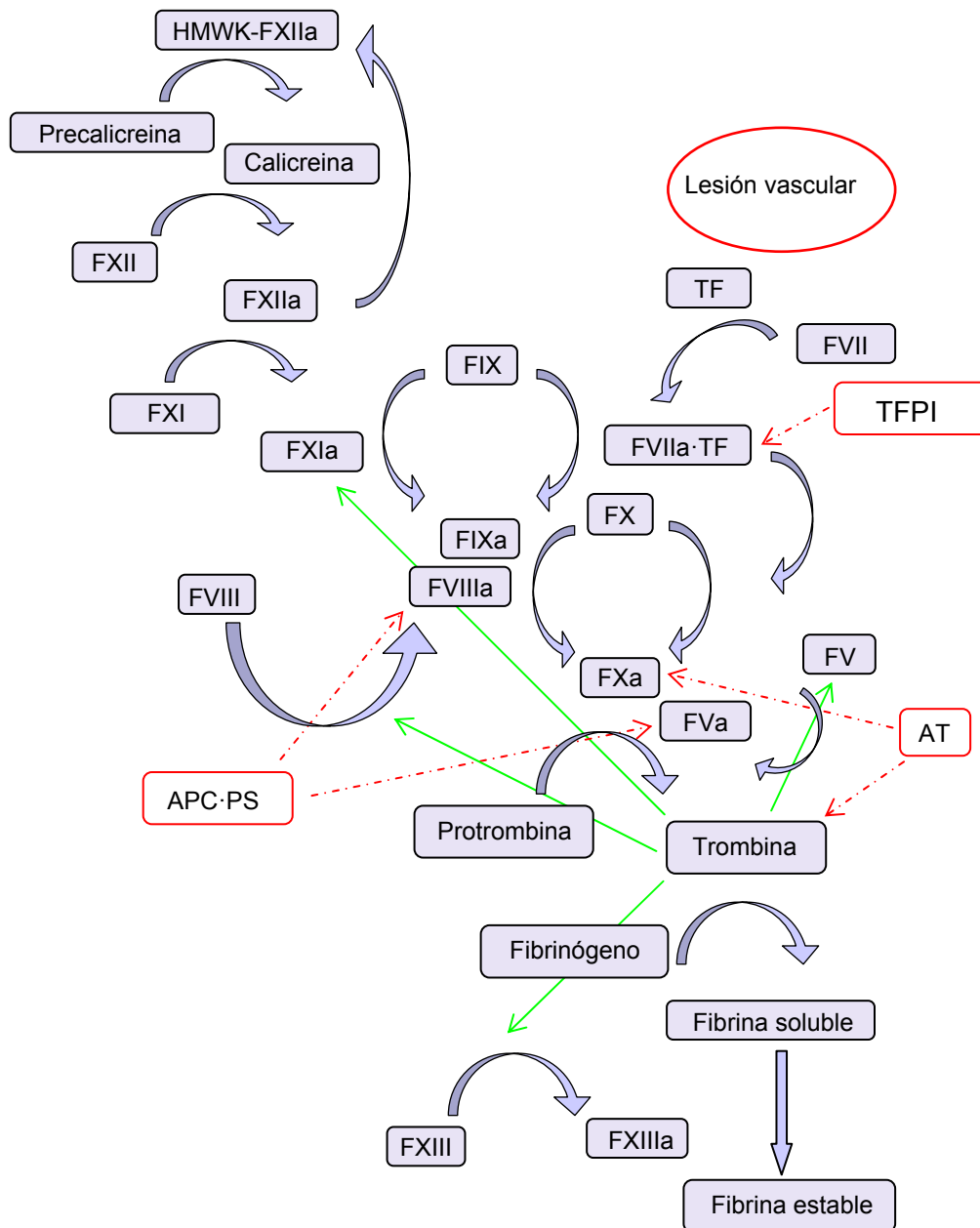
inmediatamente a aquellas zonas donde las células endoteliales están dañadas o los componentes de la matriz extracelular quedan expuestos al flujo sanguíneo a través de unas glicoproteínas adhesivas (Pytela, *et al*, 1986; Ruggeri, 2002; 2003).

La adhesión inicial depende de la interacción con el vWF, factor que sirve de puente entre las glicoproteínas de las plaquetas y el colágeno expuesto en la lesión vascular (Ruggeri, 2003). Este proceso de adhesión plaquetaria desencadena cambios morfológicos en las mismas, que incluyen una reorganización de los lípidos de membrana, principalmente caracterizados por la translocación de la fosfatidilserina de la capa interna a la capa externa de la membrana (Zwaal, 1978). La membrana de la plaqueta activada, una vez enriquecida por fosfolípidos cargados negativamente, sirve de superficie para concentrar los factores de la coagulación de forma localizada en el agregado plaquetario (Spronk, *et al*, 2003).

### **1.3 La Cascada de la Coagulación**

Cuando una lesión afecta la integridad de las paredes de un vaso permitiendo que entren en contacto los componentes de la sangre con la superficie subendotelial, tiene lugar una serie de reacciones enzimáticas ordenadas en cadena conocidas como la cascada de la coagulación (Davie and Ratfnoff 1964, Mcfarlane 1964). Este proceso amplifica extraordinariamente el estímulo procoagulante inicial a través de la activación secuencial de diversos factores, culminado en la generación de fibrina a partir de su precursor, el fibrinógeno (Figura 1).

Los factores de la coagulación se sintetizan en el hígado y muchos de ellos son dependientes de vitamina K, como es el caso de la protrombina (PT), el factor VII (FVII), el IX (FIX), el X (FX), la proteína C (PC) y la PS. Varios de estos factores circulan como formas inactivas (zimógenos o proenzimas) de proteasas serínicas; la actividad proteolítica de los factores activados se ve altamente potenciada por la unión a cofactores específicos (por ej., la unión del FIXa al FVIIIa). La activación ocurre mediante la proteólisis de un enlace específico dentro del péptido de activación, lo cual es seguido de cambios conformacionales del dominio catalítico, dejando libre el centro activo. Todas estas reacciones involucran normalmente a factores anclados a la superficie de las membranas de las plaquetas activadas, de las células endoteliales o de otras células de la sangre periférica, especialmente los monocitos activados. La unión de los factores de la cascada de coagulación a superficies fosfolipídicas con una fuerte carga negativa es dependiente de iones  $Ca^{2+}$  (Zwaal, 1978).



**Figura 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA CASCADA DE LA COAGULACIÓN.** Las letras minúsculas “a” indican factores activados. Las flechas de color rojo simbolizan los puntos de inhibición de la cascada de la coagulación y las flechas de color verde son retroactivaciones positivas producidas por la trombina. El TFPI también inhibe al FXa cuando está libre en el plasma.

La cascada de la coagulación se ha considerado tradicionalmente como iniciada por dos vías: la vía intrínseca, llamada así porque todos los componentes que participan en ella están presentes en la sangre, o por una vía extrínseca, la cual es desencadenada por una proteína de membrana de las células subendoteliales, el TF. La iniciación de la cascada por cualquiera de las dos vías converge en una vía común caracterizada por la activación del

FX, cuyo resultado final es la generación de un coágulo de fibrina (Luchtman-Jones y Broze, 1995). La vía extrínseca se inicia cuando el FVIIa entra en contacto con el endotelio lesionado, dando lugar a una pequeña cantidad de trombina, suficiente para retroactivar la cascada de la coagulación y amplificar de forma exponencial su generación (Gailani y Broze, 1991; Hoffman y Monroe, 2001; Spronk *et al*, 2003).

### 1.3.1. Vía Extrínseca

La principal vía de activación de la coagulación sanguínea después de un daño vascular *in vivo* es la vía extrínseca. (Hoffman y Monroe, 2001; Spronk *et al*, 2003). La respuesta coagulante se inicia cuando entra en contacto la proteína integral de membrana, el factor tisular, con una proteína del grupo de las proteasas serínicas dependientes de vitamina K, el FVIIa (Mann y Lawson, 1992). El TF no está estructuralmente relacionada con el resto de proteínas de la coagulación y permanece localizado en la membrana de las células que lo sintetizan, como las células subendoteliales, las células endoteliales activadas o los monocitos. El complejo FVIIa·TF activa a los factores X y IX, en contacto con los fosfolípidos de membrana y en presencia de iones calcio (Mackman 2004; Osterud y Rapaport, 1977).

El factor X activado a partir del complejo FVIIa·TF es rápidamente inhibido por el TFPI y por la antitrombina (AT) cuando se separa de la membrana de las células portadoras del factor tisular, no ocurriendo lo mismo con el FXa que permanece unido a la membrana de las células portadoras del TF. En este caso, el FXa puede combinarse con el FVa para dar lugar a pequeñas cantidades de trombina que será necesaria para la retroactivación de la cascada de la coagulación por la vía intrínseca y para la activación del factor V (FV), factor VIII (FVIII) y factor XI (FXI) (Monroe *et al*, 1996). La trombina también juega un papel muy importante en la activación de las plaquetas, donde tiene lugar la generación explosiva de esta proteasa (Hoffman y Monroe, 2001).

### 1.3.2. Vía Intrínseca

La vía intrínseca (fase de contacto) consiste en una cascada de reacciones en cadena de factores que están presentes en la sangre. Cuando el factor XII (FXII), conocido también como factor de Hageman, entra en contacto con una superficie cargada negativamente como la membrana de las plaquetas activadas o las células que constituyen la pared del vaso, se activa, dando lugar al FXIIa. El kininógeno de alto peso molecular (HMWK) que es un producto de las plaquetas, ayuda a anclar al FXII a dicha membrana cargada

negativamente, actuando como cofactor y facilitando su transformación en factor XIIa. Una pequeña cantidad de FXIIa acumulado en la superficie plaquetaria convierte la prekalikreina en kalikreina, la cual acelera la activación de más FXII en un ejemplo adicional de retroalimentación positiva. El factor XIIa junto con la kalikreina y el HMWK activan al factor XI dando lugar al FXIa, el cual a su vez, activa al FIX transformándolo en FIXa.

El factor VIII está presente en la sangre formando un complejo no covalente con el vWF, el cual evita la activación precoz del FVIII y le ayuda a estar próximo a los lugares de adhesión plaquetaria. Tanto la trombina como, en circunstancias excepcionales el FIXa y/o el FXa son capaces de activar al FVIII mediante proteólisis limitada, generando su forma activa, el FVIIIa. Finalmente, el FIXa y el FVIIIa junto con iones  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos cargados negativamente forman un complejo trimolecular llamado complejo tenasa (Xasa). El complejo Xasa convierte al FX en factor Xa. En este punto converge la vía intrínseca con la vía extrínseca, en una vía común de la coagulación.

### 1.3.3. Vía Común

La vía común se inicia con la activación del FX, bien por la vía intrínseca, extrínseca o por ambas a la vez. El factor Xa, es la primera proteasa de la vía común y junto con el FVa forman el complejo llamado protrombinasa. Este complejo, formado en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos, cataliza la conversión de la PT a su forma activa, la trombina (Dahlbäck, 2000).

La principal función de la trombina es catalizar la proteólisis de una proteína plasmática soluble, llamada fibrinógeno, para generar monómeros de fibrina soluble. Los monómeros de fibrina polimerizan de forma espontánea y forman un gel que atrapa células sanguíneas, formándose así un trombo en la pared del vaso (Schwartz *et al*, 1973).

La trombina además, activa al factor XIII (FXIII), dicho factor activo en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  media los entrecruzamientos covalentes de polímeros de fibrina formando una malla, llamada fibrina estable, que incrementa su resistencia química, mecánica y a la fibrinólisis (Ariëns *et al*, 2000).

La malla de fibrina es protegida de la degradación por el inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI). La activación de TAFI en condiciones fisiológicas es catalizada por el complejo trombina-TM (Bajzar *et al*, 1995; Bajzar *et al*, 1996); TAFI protege al coágulo de la degradación fibrinolítica, mediante la proteólisis de los residuos de lisina C-terminal de la fibrina, necesarios a su vez para reclutar los componentes de la cascada fibrinolítica: el plasminógeno, y sus activadores (t-PA y u-PA), así como la proteasa fibrinolítica, la plasmina

(Bajzar, 2000). La trombina cataliza también la activación de los factores V y VIII, resultando en una eficiente amplificación de la cascada de la coagulación.

#### 1.3.4. Inhibición de la Cascada de la Coagulación

Debido a que la cascada de coagulación consiste en una serie de reacciones que amplifican exponencialmente el estímulo procoagulante, es necesaria la existencia de mecanismos que regulen el proceso para evitar el taponamiento masivo de los vasos sanguíneos (trombosis diseminada). Dicha regulación se lleva a cabo a distintos niveles, por la acción de diferentes enzimas inhibitorias o por la modulación de la actividad de diferentes cofactores.

El primer control de la cascada de la coagulación se produce en el endotelio (apartado 1.1). El endotelio no activado tiene una gran actividad antitrombótica. Las células endoteliales expresan en su superficie la ADPasa CD39 (Marcus *et al*, 1997). Esta enzima metaboliza el ADP liberado por las plaquetas activadas, inhibiendo la agregación plaquetaria en zonas próximas al endotelio sano.

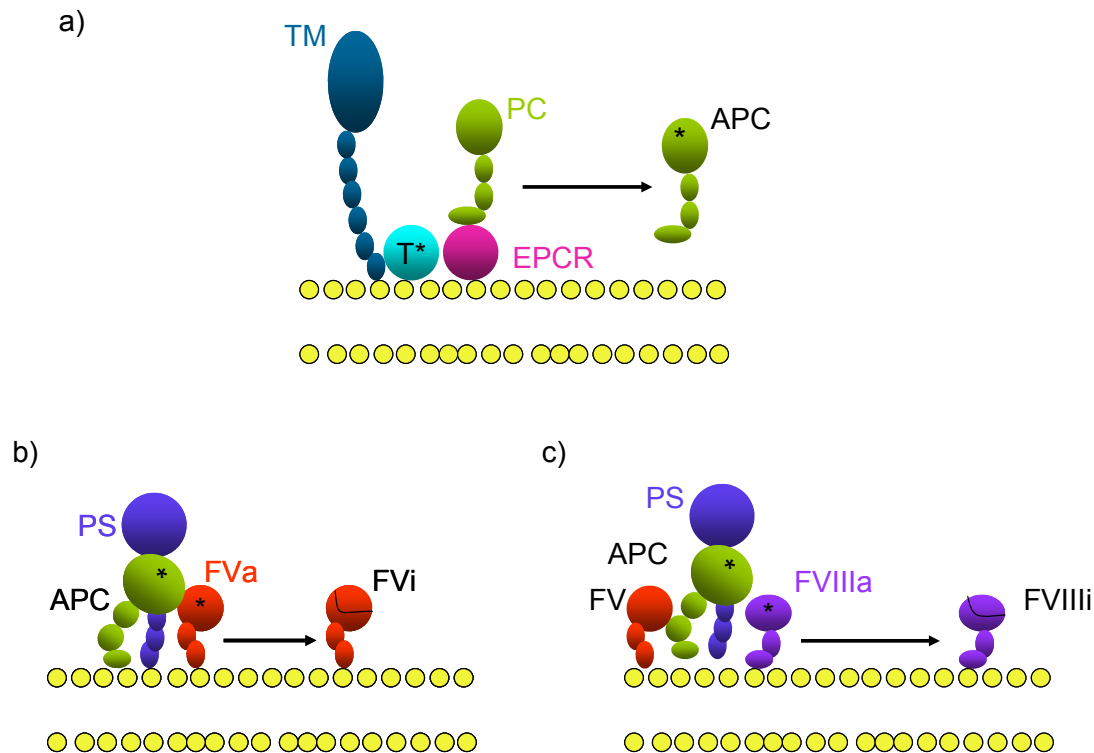
Cuando la trombina generada en la cascada de la coagulación se libera al torrente sanguíneo desde la zona del daño vascular es inhibida por la AT en presencia de glucosaminoglucanos cargados negativamente. Además, la trombina pierde toda su actividad procoagulante al unirse a la TM en la superficie de las células endoteliales intactas (Cadroy *et al*, 1997). La trombina unida a la trombomodulina ve alterada sus propiedades procoagulantes y activa a la proteína C (función anticoagulante; (Esmon 1992)) y al zimógeno de la TAFI (acción antifibrinolítica; Bajzar *et al*, 1996).

**Proteína C activada:** La proteína C es una proteasa serínica dependiente de la vitamina K, capaz de unirse a las células endoteliales a través del receptor de proteína C endotelial (EPCR, (Esmon, 2000)). Esta unión facilita su activación a APC por el complejo trombina·TM (Stearns-Kurosawa *et al*, 1996).

La APC en presencia de una superficie fosfolipídica cargada negativamente, iones  $Ca^{2+}$  y de un segundo cofactor dependiente de vitamina K, llamada proteína S, inhibe la cascada de coagulación, degradando proteolíticamente al FVa dando lugar al FVa inactivado (FVai). El FV, a su vez, actúa sinérgicamente con el complejo APC·PS para la inactivación del Factor VIIIa (Dahlbäck, 1995; Dahlbäck y Villoutreix, 2005; García de Frutos *et al*, 2007) (Figura 2). El 30 ó 40% de la PS circula libre en el plasma y sólo este porcentaje, es el que puede actuar como cofactor de la APC (Rezende *et al*, 2004), el resto está unida a una proteína de unión del sistema del complemento (C4b-BP).



La actividad proteolítica de la APC es inhibida por tres miembros de la familia de las serpinas que son: el inhibidor de la proteína C, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo I (PAI-1) y la alfa-1 antitripsina (Rezaie, 2003).



**Figura 2. a) ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA C (PC)** (Dahlbäck y Villoutreix, 2005). La PC unida a las células endoteliales a través del receptor de la PC endotelial (EPCR) es activada por el complejo TM-T. **b) DEGRADACIÓN DEL FVa.** La APC unida al cofactor proteína S (PS) degrada proteolíticamente al FVa dando lugar al FVi. **c) INACTIVACIÓN DEL FVIIIa.** El complejo APC-PS junto con el FV que actúa sinérgicamente para inactivar al FVIIIa.

**Antitrombina:** La AT es uno de los inhibidores fisiológicos más importantes de la coagulación, principalmente del FXa y de la trombina. La AT inhibe aproximadamente el 80% de la trombina activa en el plasma, aunque también lo es de otras proteasas serínicas como el FIXa, el FXa, FXIa y FXIIa (Blajchman, 1994; van Boven y Lane, 1997). La antitrombina pertenece a la superfamilia de las serpinas que son inhibidores de las proteasas serínicas, su actividad se ve potenciada por la unión con la heparina. La heparina tiene su equivalente *in vivo* en el sulfato de heparán, un proteoglicano presente en el endotelio vascular.

En la AT son reconocibles dos regiones fundamentales para su actividad inhibidora, una es el lazo que interactúa con el sitio activo de la proteasa a inhibir, y otra es la responsable de la unión con la heparina. El complejo sulfato de heparán·AT, inhibe a la trombina libre,

donde la interacción de la heparina con la trombina permite la formación de complejos ternarios de heparina·AT·trombina (Gettins, 2002). Cuando la trombina está unida a monómeros de fibrina es resistente a la inhibición por parte de la AT (Hogg y Jackson, 1989).

**Inhibidor de la Vía del Factor Tisular.** El TFPI se forma principalmente en las células endoteliales (Bajaj *et al*, 1990). El 80% del TFPI circula en el plasma formando un complejo con lipoproteínas, entre un 5 y un 20% lo hace de forma libre, presentando una mayor actividad antitrombótica.

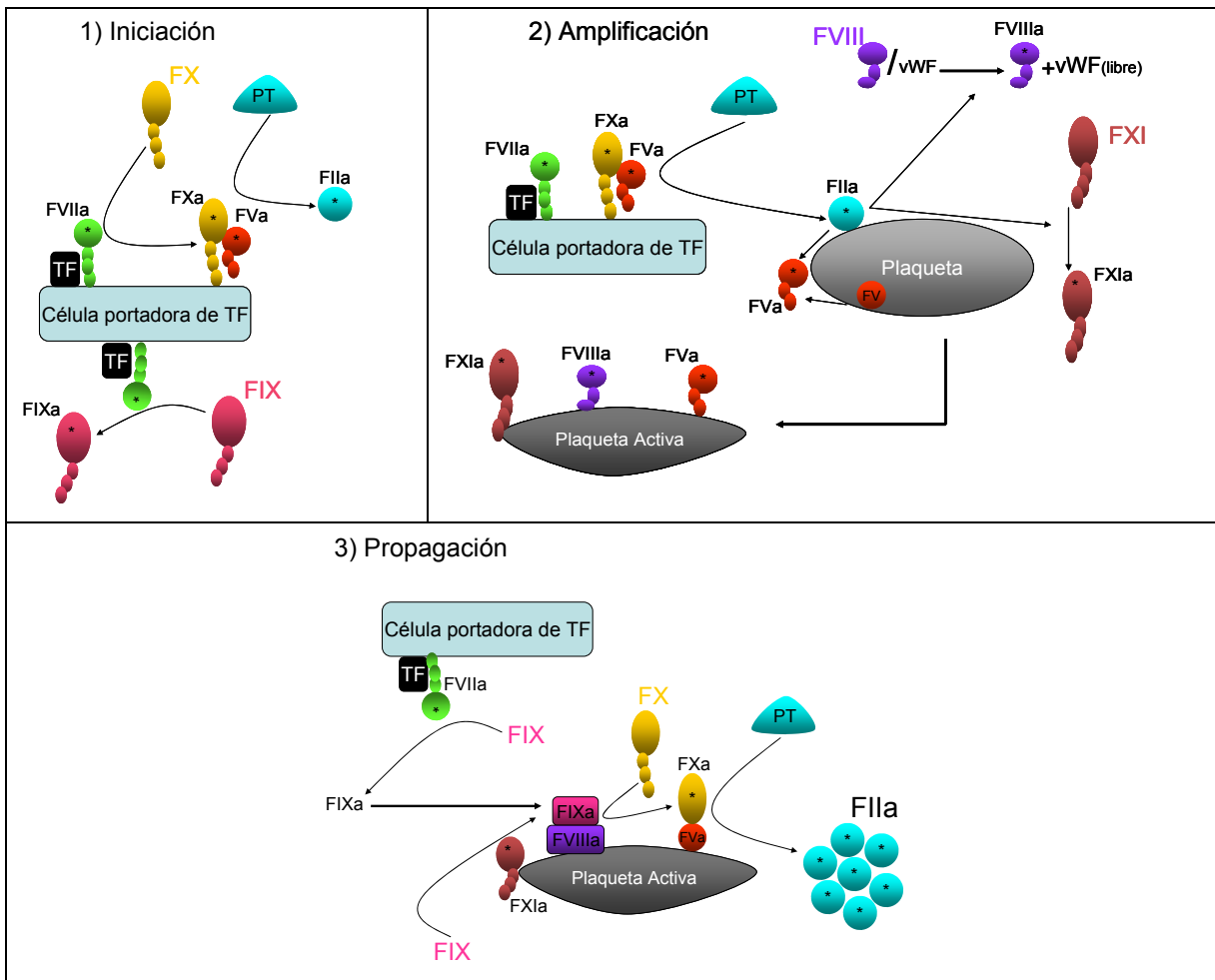
El primer paso de la función inhibidora del TFPI comienza con la inhibición reversible del FXa, para ello no es necesaria la presencia de iones  $Ca^{2+}$ , aunque se ha visto que tanto estos como la presencia de una capa fosfolipídica aumentan la potencia inhibidora (Huang *et al*, 1993). El segundo paso en el mecanismo de inhibición consiste en la unión del complejo TFPI·FXa al TF·FVIIa, formando un complejo cuaternario inactivo TFPI·FXa·TF·FVIIa en la membrana plasmática. A diferencia del paso anterior, este es dependiente de iones  $Ca^{2+}$ .

#### 1.4 Nuevo Modelo Celular de la Coagulación

De todos los modelos celulares de la cascada de coagulación presentados hasta el momento, el más logrado es el desarrollado por Hoffman y colaboradores (Hoffman y Monroe 2001). El aspecto más importante de este modelo es que considera a las células como elementos esenciales en el proceso de formación del coágulo, y demuestra que las superficies celulares, aunque presenten la misma composición de su membrana lipídica, tienen unas características especiales capaces de dirigir el proceso homeostático. La nueva teoría rompe así con el paradigma del modelo tradicional, donde el papel de la célula era únicamente el de ofrecer una superficie portadora de fosfatidilserina donde los complejos procoagulantes podían ensamblarse. A partir de aquí, se desarrolló un nuevo modelo basado en las células que reflejaba las vías de la hemostasia *in vivo*.

La coagulación ocurre en tres fases, que se desarrollan simultáneamente en diferentes superficies celulares. La primera fase, la fase de inicio, ocurre en las células portadoras de factor tisular (subendotelio); en la fase de amplificación, el sistema se prepara para la producción a gran escala de la trombina y finalmente en la tercera fase, la de propagación, ocurre en la superficie plaquetaria activada y consiste en la producción de grandes cantidades de trombina (Figura 3). Las plaquetas son seguramente el único tipo celular donde puede ocurrir de forma efectiva la coagulación debido a que su superficie está

especializada en coordinar el ensamblaje de los dos grandes complejos; Xasa y el complejo protrombinasa.



**Figura 3. 1) Fase de Inicio:** Esta fase tiene lugar en las células portadoras de FT. El complejo VIIa-FT activa pequeñas cantidades de FX y FIX. El FXa se une a su cofactor el FVa en la superficie de dichas células y generan pequeñas cantidades de trombina. **2) Fase de Amplificación:** El objetivo de esta fase es crear el marco idóneo para la generación de trombina a gran escala en la fase siguiente. La pequeña cantidad de FIIa formada en la fase anterior sirve para activar las plaquetas, éstas, durante la activación liberan cantidades de FVa sobre su superficie, además la FIIa activa al FV, al FVIII y al FXI en la superficie de las plaquetas activadas. **3) Fase de Propagación:** Esta fase ocurre en la superficie de las plaquetas activadas. El FIXa se une al FVIIIa formando el complejo Xasa (FVIIIa-FIXa), el FIXa procede o bien del que se formó en las células portadoras de factor tisular o el activado directamente por el FXIa que se encuentra en la superficie de las plaquetas activadas. El complejo Xasa activa al FX que se une a su cofactor (FVa) formando el complejo protrombinasa (FXa-FVa) que transforma gran cantidad de PT en trombina.

El modelo celular hace énfasis en el control celular de las reacciones que conducen a la formación del coágulo, permitiendo explicar algunos aspectos clínicos de la hemostasia que no son fácilmente interpretables con ayuda de la hipótesis clásica acerca de la cascada de coagulación. La hemofilia es quizás una de las patologías que podrían comprenderse mejor gracias al nuevo modelo celular. En particular, este modelo explica porqué la cantidad de

FXa generada por el complejo TF·FVIIa en las células portadoras de TF no es suficiente para compensar la pérdida de factor FIX o FVIII. La explicación que ofrece el modelo celular es que la activación del factor X por los complejos TF·FVIIa y FVIIIa·FIXa ocurre sobre superficies celulares distintas, y el FXa generado posee en cada caso un papel diferente. El FX activado por el complejo FVIIa·TF en las células portadoras del TF tendría como función principal la de unirse al FVa y activar pequeñas cantidades de trombina (Monroe et al, 1996), la cual juega un papel importante en la superficie de las plaquetas favoreciendo su activación, la del FVIII y la del FXI durante la fase de amplificación de la cascada. Este FXa es inhibido por el TFPI por dos vías: (1) una vez liberado de la superficie de las células donde se genera (Petersen *et al*, 1996) o (2) recién activado, cuando todavía forma un complejo ternario con FVIIa·TF (Lu *et al*, 2004). Por otra parte, el complejo FIXa·FVIIIa activa al FX en la superficie de las plaquetas activadas, donde se une a su cofactor el FVa y favorece la formación explosiva de trombina necesaria para estabilizar el coágulo inicial.

## 1.5 La Fibrinólisis

El sistema fibrinolítico es el encargado de la disolución del coágulo una vez se ha reparado el daño vascular. Este sistema, al igual que el de la coagulación consiste en una serie de transformaciones de precursores inactivos (zimógenos) a sus formas activas en presencia de cofactores. Como la cascada de coagulación, el sistema fibrinolítico presenta elementos de retroalimentación positiva y negativa, así como una precisa regulación por proteínas inhibitoras (Preissner y Machovich, 2004). El evento central es la conversión del plasminógeno a su forma activa, la plasmina, la cual degrada la fibrina en fragmentos solubles (Lijnen y Collen, 1982), pero que además puede hidrolizar al precursor, el fibrinógeno. Las células endoteliales liberan el t-PA que junto con el activador de plasminógeno tipo urokinasa (u-PA) convierten el plasminógeno en plasmina (Rijken *et al*, 1981).

La inhibición del sistema fibrinolítico puede ocurrir a nivel de activación del plasminógeno, principalmente por un inhibidor del activador de plasminógeno específico, el PAI-1. Durante la fase inicial de la coagulación, las plaquetas (Brogren *et al*, 2004) y las células endoteliales (Fujii *et al*, 1991) segregan PAI-1, permitiendo que se genere fibrina. Además, la plasmina es inhibida por otras serpinas, principalmente por la  $\alpha$ 2-antiplasmina. Estos procesos son específicos, de ahí que cuando la plasmina está unida a la fibrina se encuentra protegida de la acción de la  $\alpha$ 2-antiplasmina, no ocurriendo lo mismo con la plasmina que circula libre en el plasma. Por otro lado, el t-PA unido a las células endoteliales está protegido de la inhibición por el PAI-1.

Por otra parte, la activación del TAFI promueve la estabilización de la malla de fibrina, al eliminar los residuos de lisina C-terminales de la fibrina, evitando así la unión del plasminógeno, la plasmina o el t-PA a la misma e inhibiendo de forma indirecta la fibrinólisis (Bazjar, 2000).

## **2. La Hemofilia**

### **2.1 Antecedentes Históricos de la Hemofilia**

La hemofilia es una enfermedad hereditaria, caracterizada por la presencia de hemorragias, producida por la deficiencia de un factor de la coagulación. Los estudios más antiguos que se conocen sobre la hemofilia, se atribuyen a escritos judíos que datan del siglo II d.C. En la cultura judía, los rabinos detectaron que algunos niños varones, cuando se les practicaba la circuncisión, sufrían grandes hemorragias llegando incluso a morir en algunos casos. Aún cuando la circuncisión era una costumbre religiosa, los rabinos hicieron nuevos reglamentos donde se eximía de dicha práctica, a aquellos niños que tuvieran dos hermanos mayores que hubieran muerto después de la misma, por otro lado, el rabino Simón Ben Gamaliel impidió que un niño fuera circunciso porque los hijos de tres hermanas mayores de su madre habían muerto desangrados.

Existe una referencia del siglo XI donde un médico árabe de Córdoba (España), llamado Albucaín (1013-1106), llamó hemofilia a dicha enfermedad. Maimónides (1135-1204) otro rabino judío descubrió que eran las madres las que la transmitían la hemofilia a sus hijos varones. Entonces se proclamó una ley nueva: Si una madre tenía hijos con problemas de sangrado, y si ella volvía a casarse, ninguno de sus nuevos descendientes varones deberían ser circuncidados.

En 1800 un médico americano llamado John C. Otto hizo su primer estudio sobre familias con individuos hemofílicos, y en el año 1803 se empezó a estudiar la genética de la hemofilia A (HA) (Otto 1803). En 1828 el Dr. Hopff describe la enfermedad por primera vez con la palabra hemofilia. En 1911 los doctores Bullock y Fildes publicaron una importante revisión monográfica sobre la hemofilia donde se recopilaban datos referentes a la transmisión hereditaria de la enfermedad y su sintomatología clínica; sus estudios confirmaron que la hemofilia era una enfermedad hereditaria (Bullock y Fildes, 1911). En 1937 Patek y Taylor encontraron la fracción de plasma responsable de la hemofilia que llamaron "globulina antihemofílica humana" a la que en el año 1962 se le denominó como FVIII (Wright, 1962). En el año 1944 el Dr. Alfredo Pavlovsky, diferenció dos tipos de

hemofilia: por un lado la hemofilia A, caracterizada por un déficit del factor VIII y la hemofilia B (HB), causada por deficiencia del factor IX. La hemofilia representa el grupo de enfermedad hemorrágica hereditaria más frecuente, dado que está ligada al cromosoma X y se ha encontrado en todos los grupos étnicos, presentando una incidencia en la población de 1 cada 5000 recién nacidos varones (Hoyer, 1994).

Resumiendo, diremos que existen tres variedades de hemofilia, cada una se caracteriza por el déficit o ausencia congénita de un factor plasmático. La hemofilia A o clásica se debe a la deficiencia del FVIII y representa aproximadamente 80% de todas las hemofilias. La hemofilia B o enfermedad de Christmas, se origina por deficiencia del FIX y constituye el 10 o 20% del total de hemofilias y por último, la hemofilia C o enfermedad de Rosenthal se debe al déficit del FXI y es poco frecuente, del 1 o 2% del total de las hemofilias.

## **2.2 Manifestaciones Clínicas**

Los pacientes con HA se clasifican en función de los niveles de FVIII procoagulantes en plasma en: graves cuando presenta una concentración inferior a 0.01 IU/mL, moderados si es entre 0.01-0.05 IU/mL y leve si es entre 0.05-0.40 IU/mL (White *et al* 2001). Las manifestaciones hemorrágicas del paciente hemofílico, están en relación con la gravedad del sangrado, presentándose de forma espontánea en los graves y sólo después de traumatismos o intervenciones quirúrgicas en los moderados (tabla 1).

Hasta un 2% de los enfermos pueden presentar hemorragia intracraneal durante el parto. En alguna ocasión, esta puede ser la forma de presentación de la enfermedad, especialmente cuando no existen antecedentes. Las hemorragias pueden aparecer a cualquier edad o en cualquier parte del organismo. Su gravedad dependerá del volumen de la hemorragia, de su localización y de la capacidad de dejar secuelas o lesiones irreversibles.

Las localizaciones hemorrágicas más frecuentes son las que se producen en las mucosas como la epistaxis (sangrado nasal) y las gingivorragias (sangrado de las encías), estas no revisten mucha gravedad pero requieren tratamiento. Las más frecuentes son las hemorragias articulares, cuyo tratamiento es muy importante para evitar lesiones irreversibles, los hematomas musculares y la hemorragia cerebral, ambas se producen de forma espontánea por traumatismo, las hemorragias urinarias, digestivas y hemoptisis (sangrado procedente del aparato respiratorio) suelen ser menos frecuentes y surgen de forma secundaria a lesiones propias de dichos sistemas.

Clasificación	Valor del FVIII:c	Cuadro Clínico	Frecuencia
GRAVE	0,01 UI/ mL	Hemorragia espontánea desde la infancia. Hemartrosis recurrente Hematomas gigantes	60%
MODERADO	0,01-0,05 UI/mL	Hemorragias secundarias a traumatismos. Hemartrosis ocasional Hematomas en raras ocasiones	15%
LEVE	0,05-0,4 UI/mL	Hemorragias secundarias a traumatismos graves o cirugía.	25%

**Tabla 1. Hemofilia A.** Clasificación de la enfermedad, clínica y frecuencia en la población de hemofílicos, en función de la concentración del FVIII:c (Factor VIII coagulante).

### 2.2.1. Diagnóstico Clínico

Diversos trastornos hemorrágicos pueden presentar síntomas clínicos muy similares. A fin de garantizar que un paciente reciba el tratamiento adecuado, es indispensable un diagnóstico correcto. Se debería sospechar hemofilia, en pacientes con un historial de:

- Propensión a hematomas en la niñez temprana
- Hemorragias espontáneas, particularmente en articulaciones y tejidos blandos y
- Hemorragia excesiva después de un traumatismo o cirugía.

En pacientes que se sospecha que padecen un trastorno de la coagulación, para identificar la causa potencial de la hemorragia, se realizan las pruebas de rastreo; como por ejemplo: recuento plaquetario, tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT). Además para confirmar el diagnóstico, se hace lo que se conoce como: ensayo de factor (para ver la metodología de las técnicas, consultar el manual de laboratorio de la Fundación Mundial de la Hemofilia; Kitchen y McCraw).

El APTT no es una prueba específica de la vía intrínseca, pero medida junto con un tiempo de protrombina normal, es la prueba más fiable para detectar deficiencias en los factores VIII, IX, XI, y XII.

El APTT estará prolongado, en cualquiera de las deficiencias de los factores de la vía común (FV, FX, PT y en menor medida el fibrinógeno), y en presencia de inhibidores de la coagulación.

### Ensayo de factor basado en el APTT.

El principio básico de un ensayo en un tiempo de factor VIII:c (factor VIII coagulante) basados en el APTT, consiste en comparar la capacidad de diluciones de plasma estándar y de plasma prueba, para corregir el tiempo de APTT, en un plasma que se sabe que es deficitario en FVIII pero que contiene el resto de factores, necesarios para una coagulación normal.

La concentración de factor VIII se mide en Unidades/dl. Se considera que una unidad es la concentración de FVIII presente en un mililitro de plasma normal.

## **2.3 Desarrollo de Inhibidores**

Una de las mayores amenazas que sufren los pacientes tratados con concentrados de FVIII, es el desarrollo de una respuesta inmune a dicho factor. A los anticuerpos que inhiben al FVIII se les conoce con el nombre de inhibidores y se desarrollan en un 10 a un 40% de los pacientes tratados (Ehrenforth *et al*, 1992).

Los inhibidores se pueden clasificar en aloanticuerpos, cuando aparecen en pacientes transfundidos y autoanticuerpos o inhibidores adquiridos, en pacientes con una enfermedad autoinmune, como en el caso de pacientes con hemofilia A adquirida (AHA) que desarrollan inhibidores contra su propio FVIII de la coagulación.

La AHA es una enfermedad rara y poco frecuente en la población general, con una incidencia de aproximadamente una persona por millón por año (Bitting *et al*, 2009). La edad de distribución es bifásica, presentando un pico pequeño entre los 20-30 años (principalmente por los casos de mujeres en el post-parto, de ahí que en este rango de edad sea más frecuente en las mujeres) y otro pico mayor entre los 68-80 años, afectando a ambos sexos por igual. Es una enfermedad a tener en cuenta debido a la alta tasa de mortalidad que presenta sin un tratamiento adecuado (7-22%) (Franchini y Lippi 2008).

La mayoría de los anticuerpos anti-FVIII son del isotipo IgG. Los aloanticuerpos se desarrollan principalmente en niños dentro de las primeras 50 exposiciones al FVIII aunque este riesgo disminuye a partir de la 150 exposición (Kempton *et al*, 2006) y es más frecuente en pacientes que presentan una hemofilia grave, los cuales en la mayoría de los casos, tienen una pérdida total de síntesis de FVIII o la proteína está trunca y no puede ser secretada. Por lo tanto, el sistema inmune de estos pacientes no ha estado en contacto efectivo con algún péptido de la secuencia del FVIII, no pudiendo inducir una tolerancia específica al antígeno. Sin embargo, no es posible predecir qué pacientes podrían desarrollar inhibidor dentro de este grupo de alto riesgo. En pacientes con una hemofilia moderada o leve, donde el resultado de sus mutaciones es la pérdida de función pero no la



ausencia total de proteína, la prevalencia del inhibidor es menor a un 10% (Tuddenham y Mcvey, 1998) ya que están expuestos a su propio factor VIII endógeno. En todo caso, los inhibidores de estos pacientes podrían inhibir el FVIII exógeno pero no el propio.

Si se añade FVIII al plasma con un inhibidor y se incuba la mezcla, el FVIII será neutralizado progresivamente. Si se estandariza la cantidad de FVIII y el período de incubación, se puede titular el inhibidor mediante unidades, de acuerdo con la cantidad de FVIII añadido que se ha ido neutralizando. Este ensayo es conocido como ensayo de Bethesda (ver manual, Kitchen y McCraw) y puede ser realizado usando tanto FVIII humano como porcino.

En el ensayo de Bethesda, el origen de Factor VIII es una mezcla normal de plasma para los títulos anti-humanos y concentrado porcino diluido en plasma deficiente de factor VIII para los títulos anti-porcinos.

La unidad de Bethesda (UB) viene definida como la cantidad de inhibidor que neutralizará el 50% de una unidad del Factor VIII, añadido durante 2 horas a 37°C. Entendemos por título del inhibidor, a la dilución de éste presente en el plasma, capaz de neutralizar el 50% de la actividad de FVIII en un plasma normal. Cuando el título del inhibidor es menor de 5 UB/ml, se consideran de bajo título, mientras que si es igual o superior a 5 UB/ml son considerados de alto título, además, en función de cómo se estimule el sistema inmune de una persona después de repetidas exposiciones a dicho factor, tendremos: inhibidores de baja respuesta, cuando el título del inhibidor se mantenga por debajo de 5 UB/ml, o de alta respuesta, cuando el título del inhibidor sea igual o superior a 5UB/ml después de repetidas infusiones de factor FVIII (White *et al*, 2001) además, serán considerados permanentes, cuando persisten por más de 6 meses, se sabe que hay inhibidores que no permanecen de forma constante, a estos se les conoce con el nombre de inhibidores transitorios (Brown *et al*, 1999).

Las investigaciones de los últimos años han concluido, que el desarrollo de inhibidores contra el FVIII es debida a una respuesta inmune multifactorial compleja, en la que participan tanto factores genéticos como factores de riesgo no genéticos. Entre los factores genéticos, hay que destacar el tipo y localización de la mutación del *F8* (Schwaab *et al*, 1995), se ha visto que hay mutaciones que se pueden considerar de alto riesgo en el desarrollo de inhibidor, como son las grandes deleciones, siendo más frecuente el inhibidor, en aquellas que abarcan más de un dominio (69%) que las que implican uno solo (18%) (Según los datos obtenidos de la base de datos del *HAMSTeRS* y Goodeve y Peake, 2003). Las mutaciones sin sentido (o *nonsense*) localizadas en la cadena ligera de la proteína, presentan una frecuencia más alta en el desarrollo de inhibidor que las mutaciones en la cadena pesada (Oldenburg *et al*, 2004). Son también consideradas de alto riesgo la inversión del intron 22 (Tizzano *et al*, 1996) y las pequeñas deleciones o inserciones fuera

de la cadena de poli-A. Por otro lado, las mutaciones *missense* y las que ocurren en la zona de *splicing* son consideradas mutaciones de bajo riesgo. Sin embargo, las mutaciones *missense* en las regiones comprendidas entre A2 y C2 de la molécula del FVIII, aumentan cuatro veces el riesgo de desarrollar inhibidor que mutaciones *missense* fuera de esta región (Oldenburg y Pavlova, 2006). Esto puede ser debido, a que es la zona clave de unión del vWF, el cual, se cree que le confiere reducción de la antigenicidad e inmunogenicidad (Kaveri *et al*, 2007). Además, el tipo de mutación también influye en el título del inhibidor, Oldenburg y Pavlova, 2006 encontraron que el 68.8% de los pacientes con grandes deleciones desarrollaban inhibidor de alto título, mientras que pacientes con mutaciones *missense*, solo el 21.2% lo presentaban. Sin embargo, hay pacientes con la misma mutación familiar y no todos desarrollan inhibidor (Astermark *et al*, 2005), esto indica que hay otros factores que influyen en este hecho, como el fenotipo de las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Hay *et al*, 1997).

Hay múltiples isoformas de moléculas de clase II del MHC, que se agrupan en tres familias, cada isoforma se une específicamente a una secuencia única (o a varias secuencias ya que las moléculas de clase II del MHC, presentan una mayor promiscuidad) de repertorio de péptidos del FVIII (Rammensee *et al*, 1999) por lo tanto, el defecto molecular del FVIII y el fenotipo del MHC son variables codependientes en la generación de la respuesta inmune. Otros factores genéticos a tener en cuenta, son los polimorfismos en citoquinas y las moléculas reguladoras del sistema inmune. Se han descrito polimorfismos en tres de los genes que codifican para dichas moléculas, y se ha demostrado la fuerte relación que existe entre la presencia de estos polimorfismos y el desarrollo de inhibidor en pacientes hemofílicos infundidos con FVIII exógeno. Los genes son el de la interleuquina 10 (IL-10), el factor de necrosis tumoral alfa (TNFA) y el gen que codifica para la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) (Pavlova *et al*, 2009). La prevalencia, incluso la existencia de determinados polimorfismos que pueden ser considerados protectores para el desarrollo de inhibidor, no están presentes en todas las razas por igual, de ahí que el perfil étnico haga que el riesgo de desarrollar inhibidor sea más alto en unas razas que en otras, como es el caso en la raza africana frente a la caucásica, pacientes africanos americanos con HA grave presentaban una incidencia en el desarrollo de inhibidor del 51,9% frente al 25,8% en caucásicos (Scharrer *et al*, 1999). Estudios en pacientes hemofílicos tratados que presentaban un historial familiar de presencia de inhibidor tenían un mayor riesgo de desarrollarlo que otros sin antecedentes familiares (Astermark *et al*, 2001).

Dentro de los factores de riesgo no genéticos para el desarrollo de inhibidor, hay que tener en cuenta: la edad en la que se comienza a tratar con FVIII, el nivel de FVIII, el intervalo entre las dosis, la naturaleza del FVIII inyectado y los retos a los que puede estar sometido

el sistema inmune en el momento del tratamiento, como: infecciones, intervenciones quirúrgicas y grandes sangrados (Astermark, 2006). Concluyendo, podemos afirmar que todavía no se ha establecido de forma clara y categórica, la relación entre el perfil genético y los factores de riesgo no genéticos que nos permita predecir que pacientes desarrollarán inhibidores de los que no.

Los mecanismos de acción de los inhibidores son variados, aunque en líneas generales se puede decir, que comprometen los sitios de unión con otros factores de la cascada de la coagulación, aunque también se han descrito otras posibilidades intermedias, como la reducción de la cinética de liberación del FVIII-vWF o bien, la proteólisis del FVIII realizada por el propio inhibidor. Aunque los dominios típicos de unión del inhibidor al FVIII son el A2, C2 y A3, se han identificado anticuerpos dirigidos contra el resto de dominios.

## 2.4 Tratamiento Actual

En las últimas décadas se ha conseguido un notable avance en la profilaxis y tratamiento de la mayoría de las diátesis hemorrágicas. El tratamiento ha estado basado en la utilización de: derivados del plasma, de concentrados plasmáticos de factores de la coagulación, de concentrados altamente purificados del factor deficitario y actualmente se cuenta con el uso de preparados de proteínas específicas de la coagulación, conseguidas con biotecnología recombinante.

Por otro lado, los recursos farmacológicos para el tratamiento de enfermedades hemorrágicas congénitas o adquiridas han contado con escasos recursos terapéuticos.

### 2.4.1. Concentrados de Factor VIII

Los tratamientos para la hemofilia con la reposición en el plasma de la proteína deficitaria es una modalidad terapéutica ampliamente difundida y cada vez más compleja. Este tratamiento se puede llevar a cabo con:

A) Concentrados plasmáticos que se obtienen después de fraccionar, purificar y someter el plasma a técnicas específicas de inactivación viral. Estos concentrados plasmáticos se clasifican según su grado de pureza. La pureza de los concentrados de FVIII, se relaciona con el grado de eliminación de otras proteínas contaminantes en el producto final. Basándonos en este concepto se dividen en:

- *Pureza baja* equivale a menos de 10 UI de proteína por mg de producto

- *Pureza intermedia* equivale a 10–100 UI de proteína por mg de producto
- *Alta pureza* equivale a 100–1,000 UI de proteína por mg de producto y
- *Ultrapuros* equivale a más de 1,000 UI de proteína por mg de producto.

B) Factor VIIIa recombinante, los productos de tecnología recombinante se obtienen después de diversas etapas:

1. introducción del gen que codifica el factor VIII o IX en células de mamíferos,
2. multiplicación de estas para obtener un banco de células con capacidad de formar factor VIII o IX,
3. incubación de las células en un medio de cultivo apropiado para que produzcan el factor deseado,
4. purificación del factor producido por estas células
5. tratamiento para la inactivación viral y
6. estabilización del factor y liofilización.

Los productos recombinantes tienen un elevado grado de pureza. El objetivo actual del tratamiento de la hemofilia es disponer de un tratamiento sustitutivo con un factor de vida media lo más larga posible para espaciar las infusiones de factor y con vías de administración menos invasivas (por ejemplo, subcutánea).

#### 2.4.2. Otros Fármacos

Las alternativas al uso de hemoderivados en el tratamiento de las complicaciones hemorrágicas se han centrado especialmente en: Desmopresina, agentes antifibrinolíticos, aprotinina y agentes hemostáticos de uso tópico.

A) Desmopresina también conocida como DDAVP, es un análogo sintético de la hormona antidiurética, después de su administración, el compuesto eleva los niveles plasmáticos de FVIII y FvW. Se deben tener en cuenta las siguientes cuestiones:

- El uso repetido de desmopresina a intervalos cortos puede ocasionar un decremento en la respuesta (taquifilaxis).
- El compuesto no es eficaz en pacientes con hemofilia A grave, se usa en pacientes con HA moderada y leve y también en pacientes con la enfermedad de von Willebrand (vWD), cuya patogénesis deriva de un descenso exclusivo cuantitativo del vWF plasmático.

- La DDAVP no afecta los niveles de FIX y no es útil en el tratamiento de la hemofilia B.

La desmopresina es particularmente útil en el tratamiento de hemorragias en mujeres portadoras de hemofilia.

Las ventajas obvias de la DDAVP sobre productos de plasma son su coste menor y la ausencia de cualquier riesgo de transmisión de infecciones virales.

B) Antifibrinolíticos. Estos fármacos con acción hemostática son utilizados en distintas situaciones clínicas. Su mecanismo de acción se basa en la capacidad que tienen para unirse al plasminógeno en el lugar de unión a la lisina, que es el espacio por el que a su vez se une fisiológicamente a la fibrina, como consecuencia se bloquea esta unión y se frena la fibrinólisis. Como agentes fibrinolíticos se usan:

- B.1) El *ácido tranexámico* es un agente antifibrinolítico que inhibe eficazmente la activación del plasminógeno en plasmina. Fomenta la estabilidad del coágulo y es útil como terapia coadyuvante en la hemofilia y algunos otros trastornos de la coagulación. El ácido tranexámico también es útil en casos de deficiencia de FXI. Estudios realizados hace varias décadas, establecieron que el tratamiento habitual con ácido tranexámico por sí sólo, no es útil para prevenir hemartrosis en la hemofilia. No obstante, su utilidad principal radica en controlar hemorragias en superficies mucosas (e. g., hemorragias orales, epistaxis, menorragia) y en el marco de cirugías dentales
- B.2) *Ácido épsilon aminocaproico* es un medicamento similar al ácido tranexámico, pero actualmente es menos utilizado porque tiene una vida media plasmática menor, es menos potente y más tóxico.

C) Aprotinina Es un polipéptido de bajo peso molecular, que ejerce una función antiproteolítica, incluyendo inhibición de mediadores de la respuesta inflamatoria y limitando la actividad fibrinolítica endógena. Es activo solamente si se administra por vía intravenosa.

D) Agentes hemostáticos de uso tópico Desde hace algunas décadas se han venido utilizando diferentes sustancias para prevenir o interrumpir una hemorragia localizada, relacionada con una agresión quirúrgica o externa, aunque no hay una demostración clara y objetiva de su efectividad terapéutica.

Existe un producto llamado “sellados de fibrina” que es una mezcla de un concentrado de fibrinógeno purificado que contiene aprotinina con trombina cálcica humana también

liofilizada. La mezcla propiciaría la generación *in situ* de fibrina, facilitando la hemostasia local.

#### 2.4.3. Tratamiento a Pacientes que han desarrollado Inhibidor.

Uno de los mayores problemas actuales en el tratamiento de la hemofilia es el desarrollo de inhibidores contra el FVIII y FIX. El inhibidor es un anticuerpo con acción neutralizante de la función, en este caso concreto, del FVIII o FIX que desarrollan ciertos hemofílicos tras haber sido tratados con factor exógeno y en algunos casos, contra su propio FVIII como ocurre con la hemofilia A adquirida (AHA).

La presencia de un inhibidor no implica un mayor número de hemorragias pero éstas son más graves al ser más difíciles de controlar, debido a la menor eficacia de los tratamientos alternativos cuando los concentrados de FVIII y FIX dejan de ser eficaces.

El objetivo fundamental del tratamiento en los hemofílicos con inhibidores es, a corto plazo, controlar los episodios hemorrágicos y, a largo plazo, erradicar el inhibidor.

En pacientes con inhibidores de baja respuesta y en hemorragias graves de pacientes con inhibidor de alta respuesta que en ese momento tengan bajo título de inhibidor se suelen usar FVIII o FIX humano o recombinante como tratamiento más eficaz. En pacientes que tienen un título alto de inhibidor contra el FVIII humano, a fin de obtener un efecto hemostático, se usan los concentrados de complejo protrombínico activado (aPCC) que contiene los 4 factores vitamina K dependientes activados (FII, VII, IX y X además de pequeñas cantidades de FVIII) o el factor VII recombinante activado (rFVIIa). Ambos son considerados agentes capaces de activar la hemostasia por una vía alternativa, evitando la necesidad de la acción del FVIII y IX en dicho proceso (Astermark *et al*, 2007). El uso reiterado o dosis elevadas de aPCC tiene como principales efectos secundarios los fenómenos tromboticos y debido a su contenido en FVIII pueden provocar una respuesta anamnésica con incremento en el título de inhibidor (Ehrlich *et al*, 2002).

En pacientes en los cuales no hay respuesta al tratamiento y presenta una hemorragia que pone en peligro su vida se recurre a tratamientos de plasmaféresis o inmunoadsorción que elimina gran parte de los anticuerpos del orden de (entre 70-90%). Tras el descenso del título del inhibidor se aplican dosis altas de FVIII hasta conseguir niveles hemostáticos (Franchini *et al*, 2009). Está es una medida temporal puesto que la administración de nuevo factor estimulará al organismo para producir grandes cantidades de nuevos anticuerpos en días posteriores.

Otro tratamiento para la eliminación del inhibidor son los tratamientos de inmunotolerancia (ITT), del que existen diversos protocolos, los cuales difieren considerablemente en la dosis

de FVIII, la frecuencia de la administración, y el uso añadido de drogas inmunosupresoras, el denominador común de estos protocolos para la eliminación del inhibidor es la administración reiterada de concentrados de FVIII (Dimichele *et al*, 2007). En casos de fallo de inmunotolerancia en pacientes con HA grave e inhibidor se ha utilizado agentes inmunosupresores como los esteroides usados de forma única o concomitante con agentes citotóxicos como la ciclofosfamida y se ha visto en algunos estudios que no hay diferencia significativa en la remisión completa del Inhibidor con el uso de ambas terapias. El problema que encontramos es que no hay estudios claros que indique la relación entre el éxito de erradicación de los inhibidores y la toxicidad que produce dicho tratamiento en el paciente. En los últimos tiempos se ha utilizado Rituximab (anticuerpo monoclonal anti CD20) en pacientes con hemofilia A congénita, alto título de inhibidor y episodios de clínica grave en los cuales la inducción a la inmunotolerancia ha fallado. (Mateo *et al*, 2006), este inmunosupresor ya se usaba en hemofilia adquirida y en enfermedades autoinmunes pero todavía son necesarios más estudios para poder determinar la seguridad, eficacia y predecir el éxito de dicho tratamiento.

### **2.5 Nuevas Perspectivas Terapéuticas**

Muchas expectativas ha creado la terapia génica (TG), que permite la transferencia de material genético nuevo, mediante técnicas de biología molecular, a las células de un individuo, para reemplazar un gen defectuoso y proporcionarle un beneficio terapéutico. Las primeras investigaciones de TG aplicadas a pacientes con hemofilia se llevaron a cabo con el fin de conseguir una profilaxis efectiva sin necesidad de un acceso venoso, evitar el desarrollo de inhibidores y disminuir los costos terapéuticos (Lozier *et al* 2004).

La hemofilia fue una rápida candidata para la terapia mediante transferencia génica debido a que muchos tipos celulares tienen la capacidad de sintetizar el factor coagulante biológicamente activo, también a la fácil determinación de la eficacia terapéutica mediante ensayos de los factores de la coagulación ya estandarizados, y a la presencia de modelos animales grandes y pequeños con la enfermedad, usados para ensayos de eficacia y seguridad previos al inicio de ensayos en seres humanos. La estrategia más común consiste en la denominada terapia de adición génica, es decir, la terapia que entrega una copia normal de un gen que ha desaparecido o es defectuoso en el individuo. Una estrategia más reciente es la llamada edición genética, que usa enzimas especiales para producir una rotura en el ADN que hay cerca de donde está la mutación genética. La reparación de esta rotura se realiza utilizando un modelo original de gen proporcionado también durante la terapia y con los propios mecanismos de reparación de la célula. En esta estrategia, la

corrección se debe hacer en la célula que normalmente produce la proteína, dado que únicamente esta célula expresará de forma adecuada el gen una vez haya sido corregido. Se han puesto en marcha estrategias de terapia *ex vivo*, en la que se extraen células del paciente para su modificación genética, la introducción del gen normal en las células humanas puede realizarse por métodos físicos, químicos y mediante vectores virales. Se han descrito experimentos *in vivo*, en los que se administra el gen corrector al paciente mediante virus adeno-asociados (AAV). El producto de dos ensayos con vectores virales y no virales, muestra que a pesar del bajo nivel de síntesis del factor alcanzado, los pacientes requerían menos infusión del factor e informaban pocos episodios hemorrágicos, y se comprueba que un aumento mínimo de los niveles séricos del factor, reduce dramáticamente la tendencia hemorrágica. Estos estudios continúan en fase experimental hasta que su seguridad y eficacia estén absolutamente comprobadas. Finalmente comentar que también en fase de experimentación, se investiga la posibilidad de administrar el FVIII vía oral.

## 2.6 Herencia

El patrón de herencia de la HA es recesivo ligado al cromosoma X. Dado que el gen *F8* se localiza en el cromosoma X, la hemofilia afecta casi exclusivamente a varones, porque estos poseen un único cromosoma X y las mujeres se presentan como portadoras asintomáticas, ya que tienen unos niveles de actividad de factor intermedios. Sin embargo pueden aparecer mujeres sintomáticas, cuyo diagnóstico clínico y de laboratorio es compatible con hemofilia. Una mujer puede tener hemofilia A o B si:

- 1) Tiene las dos copias de su gen de *F8* o *F9* mutados.
- 2) Tiene una copia mutada del gen y una inactivación extrema del alelo sano en tejido hepático para que produzca menos o escaso factor.
- 3) Presenta una anomalía cromosómica ya sea; numérica (monosomía del X) o estructural (translocación X-autosoma)
- 4) Tiene un genotipo XY (aunque fenotipo mujer) y una mutación de hemofilia (por ejemplo Síndrome de insensibilidad a los andrógenos).

La descendencia de un varón hemofílico y una mujer sana para dicha enfermedad, dará lugar a hijas que serán portadoras obligadas y a hijos varones sanos, si además existen otros individuos afectados con hemofilia en la familia, el riesgo para la futura descendencia de padecer la enfermedad, es del 50% de tener hijos afectados e hijas portadoras obligadas. La patología molecular en una familia con historial hemofílico, suele ser única y constante y



se hereda en las sucesivas generaciones, aunque siempre hay excepciones, pudiendo encontrar más de un defecto molecular en una misma familia.

Existen mujeres que han tenido más de un hijo hemofílico pero no hay otro familiar afectado. En este caso, cabe tener en cuenta la posibilidad de que la mujer tenga un mosaicismo germinal o gonadal; es decir, que en las gónadas exista la presencia de dos líneas celulares originadas del mismo cromosoma X, una no portadora de la patología molecular y la otra con dicha patología, esto ocurre cuando durante el desarrollo embrionario incipiente del progenitor, se produce un cambio patológico (mutación), en una célula de la línea germinal, esta mutación persiste en todos los descendientes clónicos de esa célula, que finalmente darán lugar a una serie de gametos portadores de la mutación. Con fines diagnósticos, cabe considerar a estas madres como portadoras obligadas, hasta que se pueda demostrar la existencia de dicho mosaicismo.

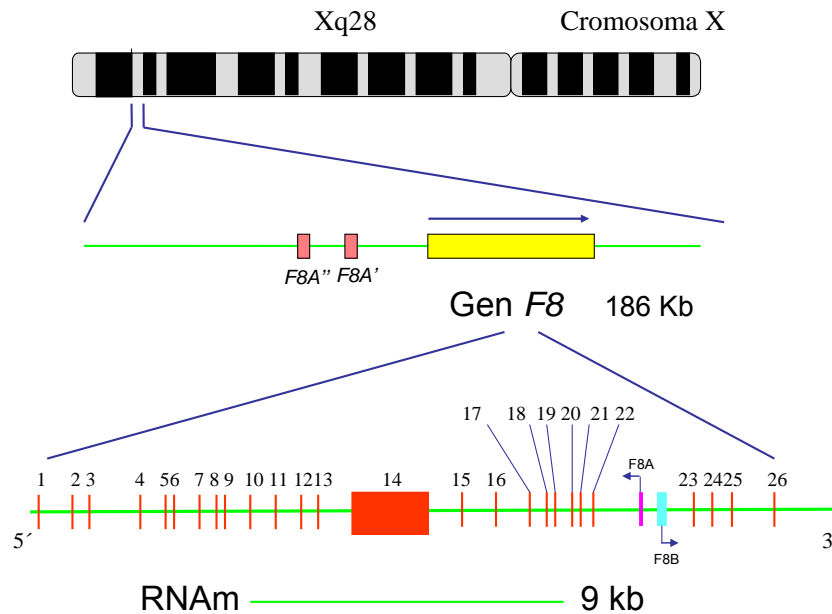
Cuando se dan casos aislados de hemofilia en una familia, se le conoce con el nombre de casos esporádicos, esto ocurre o bien porque el alelo patológico se ha transmitido a través de las mujeres de dicha familia y no se ha detectado antes o bien porque aparece una mutación de *novo* en la madre. Si por el contrario existe más de un individuo varón, no hermanos, afectados con hemofilia podríamos decir que estamos ante un caso de hemofilia familiar.

### **3. Factor VIII (F8)**

#### **3.1 Gen del F8**

El gen del *F8* se encuentra en la porción telomérica distal del brazo largo del cromosoma X, en la banda Xq28 (Poustka *et al*, 1991). Fue caracterizado en 1984 (Gitschier *et al*, 1984).

Consta de 26 exones que equivale a 186.000 pares de bases (bp) de ADN genómico que se transcribe a un mRNA de prácticamente 9 Kb, de los cuales, 7.053 nucleótidos son codificantes (Toole *et al*, 1984; Wood *et al*, 1984). Veinticuatro de los exones tienen un tamaño que varía entre las 69 y las 262 bp, mientras que los dos restantes, los exones 14 y 26, contienen 3106 y 1958 bp respectivamente. La mayor parte del exón 26 corresponde a una secuencia transcrita y no traducida. De los 25 intrones, 6 tienen más de 14 Kb, uno de los cuales, el intrón 22, contiene dos genes denominados *F8A* y *F8B* que no parecen tener ninguna vinculación fisiológica con el gen huésped (figura 4).



**Figura 4. Representación esquemática de la organización genómica y localización cromosómica del gen F8.** Dicho gen presenta un tamaño de 186 Kb constituido por 26 exones y 25 intrones. En el interior del intrón 22 hay dos genes *F8A* y *F8B*, las flechas indican la dirección de la transcripción. El gen del *F8* se transcribe en un mRNA de aproximadamente 9Kb.

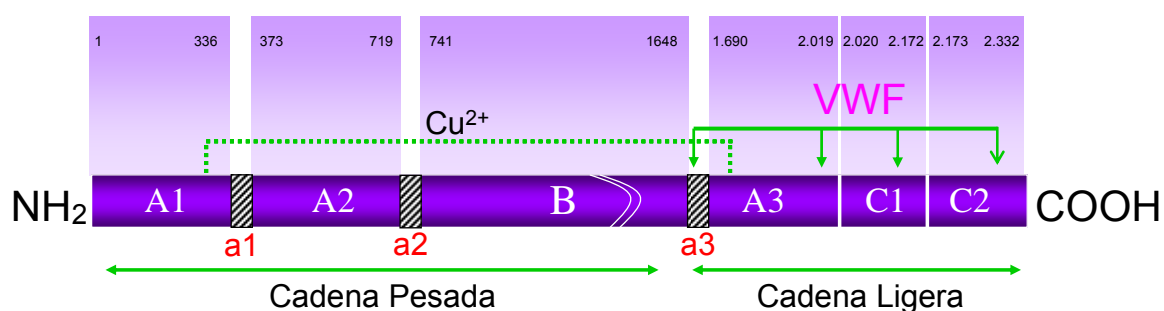
El gen *F8B* se le conoce con el nombre de gen B asociado al factor VIII (OMIM 305424), se transcribe en la misma dirección que el gen del *F8* y da lugar a un mRNA de 2.5 Kb que incluye un exón propio y los exones del 23 al 26 del gen del *F8* (Levinson *et al*, 1992). El gen *F8B* comparte un promotor bidireccional con otro gen que está también en el interior del intrón 22, que es el gen *F8A* (OMIM 305423). El gen *F8A* no contiene intrones y se transcribe en sentido opuesto (Levinson *et al*, 1990). A unas 400 Kb en posición telomérica distal del gen del *F8* se encuentran dos copias del gen *F8A* (Naylor *et al*, 1995), con una homología cercana al 100% y cuya presencia es responsable de casi el 50% de las hemofilias A graves (Lakich *et al*, 1993). Si bien los transcritos del gen *F8A* han sido detectados en una amplia variedad de tejidos, su función es todavía desconocida. En cambio el gen *F8B* parece estar relacionado con mecanismos de desarrollo embrionario, según desvelan los estudios realizados en ratones quiméricos y transgénicos (Valleix *et al*, 1999).

### 3.2 Estructura del Factor VIII

El FVIII es sintetizado como un precursor de 2.351 residuos de aminoácidos, el cual en el extremo aminoterminal presenta 19 residuos que se constituyen un péptido-señal

hidrofóbico. La proteína madura está constituida por 2.332 residuos aminoacídicos organizados en 6 dominios principales (A1-A3, B y C1-C2), y tres péptidos ricos en residuos ácidos que conectan los dominios A1-A2, A2-B y B-A3; la estructura del FVIII puede ser por tanto descrita como A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 (Pemberton *et al* 1997). Los dominios A son homólogos a los dominios triplicados presentes en el FV de la coagulación y en la ceruloplasmina, mientras que los dos módulos carboxiloterminales son dominios de tipo discoidina, ya que fue en esta proteína de hongos donde se identificaron por primera vez. Los dominios A y C del FVIII tienen una gran similitud con los del FV no sólo a nivel de secuencia, sino que también adoptan estructuras cuaternarias prácticamente idénticas (Adams *et al*, 2004 y Shen *et al*, 2008). Por el contrario, no se ha encontrado hasta el momento ninguna homología significativa entre el dominio B glicosilado y otras secuencias proteicas depositadas en las bases de datos (Kemball-Cook *et al*, 1997; Lenting *et al*, 1998). Las regiones a1-a3 no tienen homólogas en la ceruloplasmina, pero los péptidos a2 y a3 poseen sus equivalentes funcionales en el FV.

El FVIII circula por el plasma unido de forma no covalente a una proteína transportadora llamada vWF. El FVIII circula en forma de heterodímero formado por una cadena pesada, la cual incluye la región A1-a1-A2-a2 y distintos fragmentos del dominio B, y una cadena ligera, constituida por los dominios a3-A3-C1-C2; ambas cadenas contactan a lo largo de una extensa superficie, siendo su unión estabilizada por iones cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Figura 5).



**Figura 5. Estructura del FVIII.** La proteína madura está organizada en seis dominios principales; A1-A3, B y C1-C2. Los dominios A1/A2 A2/B y B/A3 están conectados por unas regiones ricas en aminoácidos ácidos denominados a1, a2 y a3 respectivamente. El FVIII circula por el plasma unido de forma no covalente al vWF, en forma de heterodímero con una cadena pesada y otra ligera estabilizada por iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.3 Biosíntesis del Factor VIII

Se ha demostrado la presencia de mRNA del FVIII en diversos órganos tales como bazo, páncreas y riñón (Wion *et al*, 1985). Sin embargo, el hígado es el órgano productor de FVIII por excelencia, más concretamente, las células sinusoidales y en menor medida, los hepatocitos (Hollestelle *et al*, 2001). A pesar de que otros órganos como el bazo y el riñón expresan cantidades similares de mRNA por gramo de tejido, el gran tamaño del hígado lo convierte en la principal fuente de FVIII (Wion *et al*, 1985). Una clara demostración se encuentra en el hecho de que pacientes hemofílicos sometidos a trasplante hepático recuperan los niveles de FVIII hasta valores de normalidad (Bontempo *et al*, 1987; Lewis *et al*, 1985). Además, el promotor del gen *F8* contiene secuencias características de expresión específica de hepatocitos (Figueiredo y Brownlee, 1995).

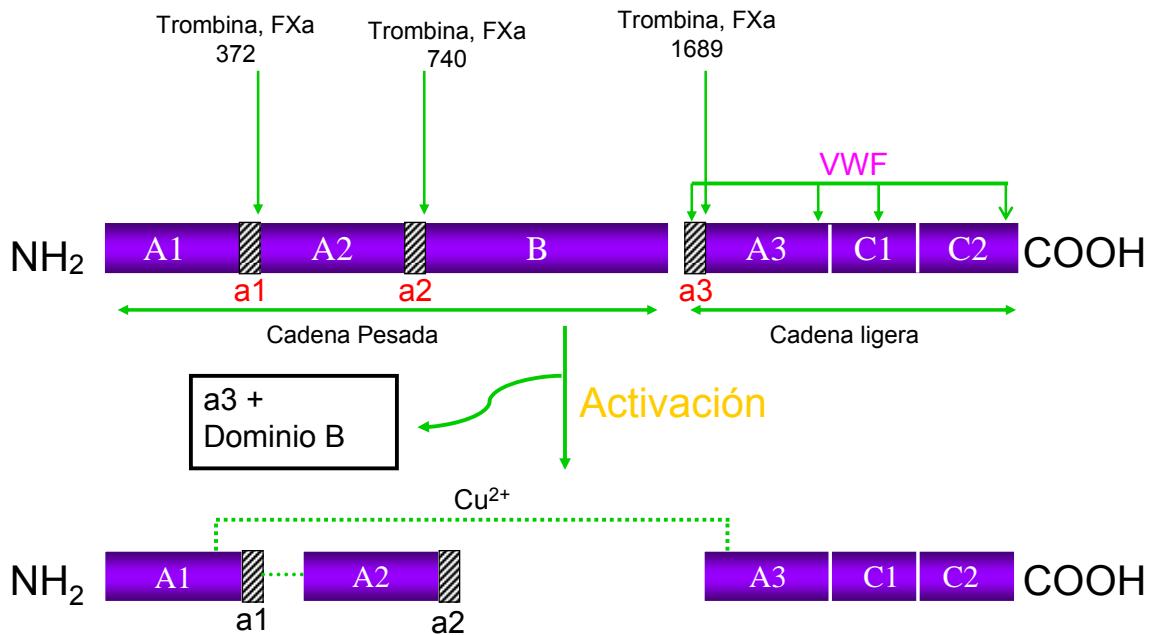
### 3.4 Modificaciones Postraduccionales

Una vez traducido, el FVIII es procesado en el lumen del retículo endoplasmático, donde es N-glicosilado a nivel de sus 25 puntos de glicosilación potenciales, 19 de los cuales se encuentran en el dominio B. Interacciona asimismo con diversos chaperones, incluyendo la calreticulina, la calnexina y la BiP (Ig-Binding Protein) (Marquette *et al*, 1995; Pipe *et al*, 1998; Swaroop *et al*, 1997). Debido a esta interacción, una proporción significativa de las moléculas de FVIII son retenidas en el retículo endoplasmático, limitando así su transporte al aparato de Golgi. En dicho transporte se encuentra implicada una lectina intracelular de membrana, denominada de forma abreviada ERGIC-53 (Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment-53) también conocida como LMAN1. Mutaciones en el gen que la codifica, dan lugar a deficiencias combinadas de Factor V y FVIII (Nichols *et al*, 1998). Una vez en el aparato de Golgi, el FVIII sufre varias modificaciones postraduccionales adicionales: modificación de las N-glicosilaciones previas, O-glicosilaciones y adición de grupos sulfato en varios residuos de tirosina (Lenting *et al*, 1998). Previa a su secreción al torrente circulatorio, el FVIII es sometido a proteólisis intracelular. En las regiones central y carboxiterminal del dominio B se encuentra el motivo Arg-X-X-Arg, el cual es reconocido por proteasas intracelulares de la familia de las subtilisinas (Hutton *et al*, 1990). Si bien la endoproteasa responsable no ha sido aún identificada, la proteólisis se realiza en el extremo C-terminal de las argininas 1313 y 1648. Estos cortes rompen la unión covalente entre las cadenas pesada y ligera, dando lugar a una molécula heterodimérica de unos 330.000 Da (incluyendo las modificaciones post-traduccionales), estabilizada por iones  $Ca^{2+}$ . De forma inmediata a su secreción al torrente sanguíneo, el FVIII se une de forma no covalente al

Factor von Willebrand que es una glicoproteína multimérica que actúa como proteína transportadora; el vWF también ayuda a la adhesión de las plaquetas en la superficie donde se produce un daño durante la hemostasia. Se ha descrito que todas las regiones de la cadena ligera del FVIII poseen sitios de unión al vWF; en particular se ha demostrado interacción con la región acídica a3 y la región amino terminal del dominio A3 (Leyte *et al* 1989), el dominio C2 (Shima *et al*, 1993, Saenko *et al* 1997), y más recientemente se han descrito sitios de unión en el dominio C1 (Jacquemin *et al* 2000). Uno de los aspectos funcionales de la interacción FVIII-vWF parece ser, la prevención de uniones prematuras del FVIII con los componentes del complejo X-asa. Así, la unión de la cadena ligera del FVIII al FIXa es inhibida por el vWF. De hecho, la afinidad por éste último es unas 100 veces superior a la que presenta por el FIXa (Lenting *et al*, 1994). También se ha demostrado que unido al vWF, el FVIII es menos susceptible al ataque proteolítico de varias proteasas, incluyendo la proteína C activada (APC) y el FXa (Fay *et al*, 1991; Rick *et al*, 1990). Esta asociación con vWF juega un papel fundamental en la fisiología del FVIII, al estabilizar su estructura heterodimérica.

### 3.5 Activación e Inactivación del FVIII

En condiciones fisiológicas, la activación del FVIII se produce casi exclusivamente por la trombina, la cual corta los conectores entre los dominios a1 y A2, a2 y B, y a3-A3 (posiciones Arg372, Arg740, Arg1689); aunque el FXa también puede realizar estos cortes (Eaton *et al* 1986) (Figura 6). El corte a continuación de la arginina 372 de la cadena pesada expone un sitio de unión del Factor IXa, mientras que el corte en la Arg740 provoca la liberación de los fragmentos del dominio B unidos a la cadena pesada: Finalmente, la hidrólisis del enlace Arg1689-Ser1690 en la cadena ligera elimina la región acídica a3. El resultado de estos tres cortes proteolíticos es un heterotrímero, el FVIII activado (FVIIIa), se disocia del vWF y se une al FIXa y membranas fosfolipídicas para formar el complejo Xasa (Lollar *et al* 1988).



**Figura 6. Activación del FVIII circulante en plasma.** La activación del cofactor se produce principalmente por la acción de la trombina, la cual corta en las posiciones Arg372, Arg740, Arg1689, eliminando el dominio B y la región acídica a3, dando lugar a un heterotrímero, además de cambios conformacionales que provocan la liberación del FVIII con el vWF.

Se ha reportado que el dominio C2 del FVIII posee un sitio de unión para la trombina que regula la proteólisis del FVIII, aunque no se conoce su localización exacta (Nogami *et al*, 2000). Subsiguientes degradaciones proteolíticas del FVIIIa por parte de la proteína C activa, la plasmina, el FIXa o el FXa en diversas posiciones (ej.: Arg36, Arg336 y Arg562), inactivan rápidamente el cofactor (Lenting *et al* 1998). Adicionalmente, se produce una inactivación debida a la disociación del dominio A2, el cual está unido más débilmente al heterodímero A1-a1/A3-C1-C2. Ambos procesos son de vital importancia para atenuar la cascada de la coagulación, dado que una coagulación excesiva produciría fenómenos trombóticos contraproducentes para el organismo, en algunos casos, posiblemente más dañinos que la propia hemorragia.

### 3.6 Interacción con los componentes de la vía intrínseca de la coagulación

En el ensamblaje del complejo Xasa, el factor VIIIa interactúa tanto con la membrana fosfolipídica, con el FIXa como con el sustrato, factor X. La unión al FIXa involucra dos sitios fundamentales, uno situado en el dominio A3, que incluye en particular el lazo 1811-1818, y otro, situado en el dominio A2, que incluye las regiones 484-508 y 558-565. Como mencionamos anteriormente, estos sitios del dominio A2 quedan expuestos gracias a los

cortes proteolíticos en las posiciones 372 y 740 de la cadena pesada por la trombina o por el FXa (Fay *et al*, 2001). La formación del complejo FVIIIa·FIXa provoca un gran incremento en la eficiencia catalítica del FIXa para activar al factor X. En este proceso, el FVIIIa parece realizar tres acciones fundamentales. (1) Como un intermediario pasivo, contribuyendo a anclar el complejo Xasa a las membranas procoagulantes ricas en fosfatidilserina de las plaquetas activadas o de las células endoteliales. (2) Incrementando la actividad catalítica intrínseca del FIXa, al modificar su sitio activo, y (3) “presentando” el sustrato, FX, al sitio activo del FIXa unido. El dominio C2 es principalmente responsable por la alta afinidad que tiene el FVIII por membranas fosfolípicas ricas en fosfatidilserina, en particular residuos hidrofóbicos cercanos en la estructura 3D, incluyendo M2199, F2200, L2251, L2252 y V2223 los cuales se solapan con uno de los sitios de unión al vWF (Pratt *et al*, 1999).

#### **4. Análisis molecular**

El análisis molecular del gen *F8* se estudia con dos objetivos: uno desde la investigación de la patología molecular del gen *F8* y el otro desde el punto de vista del diagnóstico de portadoras y diagnóstico prenatal. El análisis genotípico del gen puede ser directo o indirecto. Como ya hemos indicado con anterioridad, el gen del factor 8 presenta un tamaño de 186 Kb. distribuidos en 26 exones, su gran tamaño y la heterogeneidad genética, hace muy arduo el análisis de cada uno de los pacientes. Una de las patologías más comunes representando el 50% de los casos graves de hemofilia, es la inversión del intrón 22 (Antonarakis *et al*, 1995) que ocurre por una recombinación homóloga del gen F8A situado en el intrón 22 del gen del factor 8, con dos regiones homólogas situadas fuera de dicho gen, hacia la región telomérica del brazo largo. Según con la región que recombine, la inversión será proximal o distal. La segunda patología que se busca es la inversión del intrón 1 (Bagnall *et al* 2002), que tiene una frecuencia de aproximadamente el 2 al 5% del total de los casos graves, y se da también por una recombinación homóloga entre una región situada en el intrón 1 (int1h) y otra situada fuera de él. Una vez que se han descartado ambas mutaciones el paso siguiente sería el cribado de mutaciones de la región codificante del gen, las zonas flanqueantes a la zona de *splicing* y la región promotora. Hasta la fecha, se han comunicado más de 1.000 mutaciones diferentes del gen del *F8* en pacientes hemofílicos en la base de datos HAMSTeRS (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>), que excluye las inversiones mayoritarias pero en la que se registran la grandes deleciones (11%), las pequeñas deleciones (16%), las inserciones (6%) y las sustituciones (67%). Sin embargo, a pesar del análisis sistemático por secuenciación completa, incluyendo la región promotora

(Boekhorst *et al*, 2005), se ha observado que no es posible identificar la mutación responsable en un porcentaje minoritario de pacientes con diagnóstico de HA (aproximadamente 2%) (Klopp *et al*. 2002).

El estudio indirecto se realiza mediante los polimorfismos o marcadores de ADN que se sitúan en el interior del gen del *factor 8* (intragénicos) o que están cerca de él, en la región vecina al lugar de ubicación del gen en el cromosoma X (extragénicos). El conjunto de los marcadores de un individuo es el haplotipo, que es la suma de todos los marcadores en uno de los dos cromosomas, y permite identificar aquel del varón afectado para luego determinar el de las mujeres de la familia. Para ello, es fundamental disponer de la muestra del paciente hemofílico que nos permitirá comparar con sus otros familiares y determinar la segregación del cromosoma X en la familia. En ciertos casos, el estudio indirecto por exclusión permite también descartar posibles portadoras aunque el hemofílico ya estuviera fallecido.

Los marcadores intragénicos que se han utilizado para el estudio de la hemofilia A son la repetición de un dinucleótido (CA/TG)<sub>n</sub> en el intrón 13 y 22 (Lalloz *et al* 1994) y un dimorfismo para la enzima de restricción *Bcl*I, situado en el intrón 18 (Peake *et al* 1993). En algunos casos estos marcadores dentro de una familia no son informativos, impidiendo distinguir el alelo portador de la patología molecular de aquel que no lo es, lo que dificulta llegar a un diagnóstico de portadoras en la familia. Para ello es necesaria la búsqueda de más marcadores que, según la población estudiada, pueden ampliar y complementar la información obtenida con los otros marcadores más comunes.

## **5. Asesoramiento genético y opciones reproductivas**

En circunstancias ideales, el asesoramiento genético se debe realizar antes de que cualquier mujer con riesgo de la familia se plantee tener descendencia. El asesoramiento genético no se limita a la mención de un riesgo de recurrencia. Incluye todo un proceso por el cual es posible asegurar que la familia consultante conoce las implicaciones de la enfermedad, la forma cómo se hereda, la probabilidad de que vuelva a suceder, los factores de error en los cálculos de riesgo y las alternativas que existen para que los consultantes, disponiendo de todos estos elementos, puedan elegir el camino a seguir. En el caso de que la mujer consultante esté embarazada de menos de 12 semanas en el momento de la consulta y se detecte que es portadora de la mutación, se puede llevar a cabo el estudio prenatal, mediante una biopsia de la vellosidad corial que consiste, en la toma de una pequeña muestra de corion, del que se extrae el material genético que es idéntico al del feto. A partir de esta muestra, se determina el sexo y en caso de ser un varón



y conocer la mutación familiar, a través del estudio directo se determina la presencia o no de la mutación. Otra alternativa es determinar el haplotipo de riesgo a través del estudio indirecto con marcadores. Para mujeres con algún hijo hemofílico que deseen tener más descendencia, en los últimos años, se han desarrollado técnicas que permiten el análisis genético del embrión incluso antes de que éste sea transferido al útero materno; este procedimiento se conoce como diagnóstico genético preimplantacional (DGP) (Tabla 2).

	Diagnóstico prenatal	Diagnóstico preimplantatorio
<b>Fecundación</b>	Natural	<i>In vitro</i> previa estimulación hormonal
<b>Material analizado</b>	Vellosidad corial (11 sem.)	Células embrionarias (3días)
<b>Limitaciones metodológicas</b>	Permite realizar el diagnóstico de mutaciones por marcadores	Limitaciones en el diagnóstico según la mutación
Embarazo	Generalmente único	Se implantan hasta tres embriones
<b>Comprobación del resultado posterior</b>	No es necesaria	Por biopsia corion (11 sem.) o amniocentesis (14-16 sem)
<b>Aspectos éticos</b>	Interrupción del embarazo	Descartar embriones

Tabla 2. Características del diagnóstico prenatal y preimplantatorio.

El DGP es un método de análisis que resulta de la combinación de técnicas de reproducción asistida y técnicas de genética molecular. Por ende, debe ir necesariamente ligado a tratamientos hormonales de fecundación *in vitro*, y manipulación embrionaria aun cuando la pareja que posea el riesgo genético tenga probada fertilidad.

Si no es posible realizar o disponer de datos del estudio genético, es posible realizar el diagnóstico fetal mediante una funículocentesis. Se trata de obtener una muestra de sangre fetal y hacer una dosificación de FVIII o FIX entre las 19 y 21 semanas de embarazo. Este recurso se aplica en casos de portadoras obligadas sin ninguna información molecular o ante presuntas portadoras con un diagnóstico molecular no concluyente. Conviene recordar que un valor normal descarta que el feto sea hemofílico, pero no que la madre sea portadora, y que un valor patológico no sólo confirma el estado de afectado fetal, sino también el estado de portadora de la madre.

## 6. La hemofilia B y la enfermedad de von Willebrand

Otros trastornos frecuentes que pueden confundirse clínicamente con la hemofilia A son la hemofilia B y la enfermedad de von Willebrand.

## 6.1 Hemofilia B o déficit de Factor IX (FIX)

La hemofilia B (HB) conocida también como enfermedad de Christmas, es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X que tiene un índice en la población de aproximadamente de 1 cada 30.000 varones. Se origina por una disminución en los niveles de actividad del factor IX presentando características clínicas similares a la HA, incluso se clasifica en leve, moderada y grave de acuerdo a la actividad de dicho factor.

El gen *F9* tiene un tamaño de 34.000 pares de bases y se localiza en el brazo largo del cromosoma X, en el locus Xq27.1. Está constituido por 8 exones separados por 7 regiones intrónicas de tamaño variable (Anson *et al* 1984). El mRNA del *F9* tiene un tamaño de 2,8 Kb y codifica para una glucoproteína de 415 aminoácidos. Los 8 exones dan lugar a 7 dominios funcionales.

Se sintetiza en el hígado como una única cadena polipeptídica (pre-pro-factor IX). Requiere una serie de modificaciones postraduccionales llevadas a cabo en el retículo endoplasmático para la excreción final como proteína madura por el aparato de Golgi en forma de polipéptido monocatenario.

En la HB un 3-5% de los pacientes presentan grandes deleciones, la mitad de las cuales abarcan la totalidad del gen pero no se han detectado rearrreglos recurrentes como las inversiones del intrón 1 y 22 de la HA. Esto puede deberse a que el *F9* tiene intrones más pequeños y por estar ubicado más cerca del centrómero que el *F8* siendo quizás menos vulnerable en la meiosis para que ocurra una recombinación. Casi todas las mutaciones del gen del *F9* son puntuales y heterogéneas (cada familia tiene una mutación diferente) siendo la gran mayoría sustituciones aminoacídicas, el mayor número de mutaciones las podemos encontrar en el exón 8, ya que representa casi la mitad de la región codificante. En la HB son frecuentes las mutaciones ubicadas entre el aminoácido -21 y +13 de acuerdo con el inicio de la transcripción del gen, dichas mutaciones se han asociado con una mejoría del fenotipo con la edad del paciente (fenotipo Leiden). Esto se debe al aumento de testosterona que mejoraría la transcripción, aumentando los niveles de factor IX.

Existe una base de datos de las mutaciones del gen del *F9* (<http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html>.) Dicha base de datos es un punto de referencia para los investigadores en cuanto a la descripción y caracterización de mutaciones. Los conceptos y aspectos del análisis indirecto descritos para la HA y el gen del *F8* son aplicables al *F9*.

## 6.2 Enfermedad de von Willebrand (vWD)

La enfermedad de von Willebrand (vWD) es una diatésis hemorrágica congénita causada por una anomalía cualitativa y/o cuantitativa del vWF que se transmite con carácter autosómica dominante o con menos frecuencia recesiva. Se trata de un déficit cualitativo o cuantitativo del vWF cuya función en plasma es favorecer la unión de plaquetas al endotelio alterado y proteger al FVIII de la degradación proteolítica. Es la coagulopatía hereditaria más frecuente aunque su incidencia y prevalencia es variable según las poblaciones estudiadas y los métodos utilizados para el diagnóstico. Esto se debe a que existen formas muy leves que no se diagnostican y otras que pueden confundirse con la hemofilia A. El gen del *vWF* está ubicado en el brazo corto del cromosoma 12, es también uno de los más grandes que se conoce con 178 kb de ADN genómico y 52 exones, por lo que su estudio molecular es bastante laborioso. Asimismo la gran variedad de patología molecular explica al menos 6 tipos diferentes de vWD: el tipo 1, el tipo 3 y cuatro formas de tipo 2. Los tipos 1 y 3 son defectos cuantitativos mientras que las cuatro formas tipo 2 son variantes cualitativas. El sitio web con la base de datos de las mutaciones del vWF es: <http://www.vwf.group.shef.ac.uk/vwd.html>.

### **III. HIPÓTESIS DE TRABAJO**



El estudio molecular de la Hemofilia A tiene un interés universal, dado que es una enfermedad hereditaria frecuente y se han descrito afectados en todas las poblaciones. El tratamiento de la hemofilia así como las complicaciones del mismo (aparición de inhibidores) depende de la patología molecular de cada paciente. La propuesta en esta tesis doctoral es avanzar en este campo, estableciendo las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La identificación del cromosoma X que lleva la mutación y su transmisión a la descendencia se realiza por medio del estudio indirecto con marcadores intragénicos. El número de marcadores identificados con este fin es limitado y en algunas familias, dichos marcadores no son informativos. En consecuencia no se puede establecer el estado de portadoras ni el estudio de sus embarazos para excluir la probabilidad de que tengan un hijo afectado con la enfermedad. Por lo tanto, se plantea la búsqueda de nuevos marcadores que sean informativos y aumenten la posibilidad de resolver y establecer la identificación del alelo responsable de la mutación y la transmisión del mismo en la descendencia, mejorando la calidad del asesoramiento genético.

2. Es importante determinar en cada paciente su patología molecular mediante el estudio directo del gen del *F8* y establecer una relación con su fenotipo. Para ello se ha postulado llevar a cabo el estudio completo de la secuencia codificante del gen, las regiones flanqueantes a la zona de *splicing* de cada uno de los exones que lo forman, así como el estudio de su región promotora en un grupo numeroso de pacientes hemofílicos españoles. La identificación de estas mutaciones permitiría 1) correlacionar el cambio nucleotídico con la clínica del afectado y la tendencia a desarrollar inhibidores, 2) identificar exones “*hotspot*” candidatos para la búsqueda acelerada de mutaciones para obtener el diagnóstico molecular, 3) lograr el diagnóstico directo de portadoras en las respectivas familias.

3. Las mutaciones nuevas (no descritas previamente en pacientes hemofílicos) que predicen un cambio de aminoácidos (mutaciones *missense*) deben confirmarse en diferentes niveles. Entre ellos destacan el genealógico (la segregación del alelo mutado se corresponde con los afectados y las portadoras); el poblacional (distinción entre mutación y polimorfismo); el del gen propiamente dicho (codones previamente afectados por otras mutaciones); el de la biología estructural de esos cambios (incluyen las características físico-químicas de los aminoácidos, las interacciones de las regiones involucradas y modelos *in silico* con estos cambios). La biología estructural permite predecir si el cambio ocurre en una región que afecta al plegamiento de la proteína o a sitios de unión con otras proteínas que son esenciales para el ciclo de vida del factor procoagulante o por el contrario, se da en una

región menos importante. Las predicciones de estos análisis estructurales deberían corresponderse con la clínica del paciente.

4. Hay casos especiales en los que el diagnóstico de la patología molecular se hace más complicado. Por ejemplo pacientes que no muestran cambios con los métodos de análisis empleados, mujeres con hemofilia, y cuando la mutación encontrada no puede detectarse en las mujeres portadoras. Así, el uso de otras técnicas, como la cuantificación con PCR a tiempo real y la validación del Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) podrían resolver esas situaciones problemáticas.

## **IV. OBJETIVOS CONCRETOS**





Sobre la base de los puntos comentados anteriormente, el principal objetivo de esta tesis es el análisis molecular del gen del *F8* con los siguientes objetivos concretos:

1. Descubrir nuevos marcadores genéticos del gen del *F8* de la coagulación.
2. Identificar y caracterizar la patología molecular de pacientes españoles con hemofilia A.
3. Establecer una correlación entre el genotipo–fenotipo en pacientes con hemofilia A.
4. Analizar por medio de la biología estructural las nuevas mutaciones *missense* identificadas en dicho gen.
5. La validación y aplicación de nuevas técnicas para el estudio molecular de pacientes afectados de hemofilia A con características especiales: mujeres con expresión fenotípica y aquellos sin patología molecular detectable a través del estudio directo habitual.



## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**



Para la realización de este trabajo de tesis se ha estudiado una población de 271 pacientes hemofílicos españoles (197 graves, 74 moderados y leves). Se han incluido además mujeres portadoras obligadas o en estudio (n=70), otros miembros de la familia como padres y hermanos de afectados (n=15) y 141 mujeres y 100 hombres de la población general; de todos ellos obtuvimos un informe de consentimiento de acuerdo con la declaración de Helsinki, obteniendo la aprobación desde el Comité Institucional de Ética del Hospital de la Santa Creu y Sant Pau de Barcelona para poder llevar a cabo el estudio.

Las muestras de ADN se obtuvieron a partir de linfocitos de sangre periférica por el método de extracción salina ("salting out" descrito por Miller *et al* 1988). Una vez obtenida la muestra de ADN, se procedió a diferentes análisis como se especifica en las publicaciones científicas que se adjuntan. A lo largo de este trabajo se pusieron a punto y desarrollaron una serie de protocolos. La descripción resumida de los más significativos se incluyen a continuación.

## 1. **ESTUDIO INDIRECTO CON MARCADORES:**

El estudio indirecto con marcadores representa una serie de técnicas que nos permiten identificar el cromosoma X portador de la mutación en una familia. Para ello se utilizan distintos polimorfismos extragénicos e intragénicos.

Para la detección de todos los marcadores se sigue un protocolo básico general a partir del cual existen una serie de particularidades propias de cada marcador:

A) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en la amplificación selectiva de regiones específicas de ADN *in vitro*, utilizando la actividad de la enzima Taq polimerasa partiendo de una cadena molde y un pequeño oligonucleótido inicial (cebador también conocido como primer) en presencia de nucleótidos en exceso y magnesio. Las condiciones y los cebadores utilizados con cada uno de los marcadores se pueden ver en la (Tabla 3).

<b>Marcadores Extragénicos</b>					
<i>Marcador</i>	<i>Técnica</i>	<i>Cebadores</i>	<i>Tamaño</i>	<i>T<sup>a</sup>H</i>	<i>Descrita</i>
St-14	PCR	HA STR14F _ 5' GGCATGTCATCACTTCTCTCATGT 3' HA STR14R _ 5' CACCACTGCCCTCACGTCACTT 3'		65°C	Oberlé et al, 1985
<b>Marcadores Intragénicos</b>					
<i>Marcador</i>	<i>Técnica</i>	<i>Cebadores</i>	<i>Tamaño</i>	<i>T<sup>a</sup>H</i>	<i>Descrita</i>
Intrón 1	PCR Fluorescente	HA INT1F <b>FAM</b> _ 5'ATGCAAAGAAGCTGAAATGGG 3' HA INT1R _ 5' GACCCTGTACTTTTACCATTG 3'	141-154pb	58°C	En este trabajo
Intrón 9	PCR Fluorescente	HA INT9F <b>NED</b> _ 5' GAGGTGGGATTGATATTTTCA 3' HA INT9R _ 5' GCACTCCAGCCTGGGTGAC 3'	145-155pb	55°C	En este trabajo
Intrón 13	PCR Fluorescente	HAIN13 <b>FNED</b> _ 5'TGCATTCAACTGTACATAATGTATCTT3' HA INT13R _ 5' CCAAATTACAGATTGAATAAGCC 3'	133-149pb	48°C	Lalloz et al 1991
Intrón 18	PCR+ <i>BclI</i>	HAIN18F_ 5'TAAAAGCTTAATATGGTCTAGGC 3' HAIN18R_ 5'TTCGAATTCTGAAATTATCTTGTT 3'	142pb	55°C	Peake et al, 1993
Intrón 22	PCR Fluorescente	HA INT22F <b>FAM</b> _ 5' TTCTAAGAATGTAGTGTGTG 3' HA INT22R _ 5' TAATGCCACATTATAGA 3'	76-88pb	48°C	Lalloz et al 1994
Intrón 25	PCR Fluorescente	HA INT25F <b>HEX</b> _ 5' AGTCCAAGATCAAGGGGTAGG 3' HA INT25R _ 5' CATCACATTCCAGCCTGGACT 3'	150-165pb	60°C	En este trabajo

**Tabla 3. Marcadores extragénicos e intragénicos** utilizados en el estudio indirecto para la determinación del alelo portador de la patología molecular de la hemofilia A. T<sup>a</sup>H = Temperatura de Hibridación.

B) Análisis del producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa.

B.1 Agarosa al 1.5% (Genotek) en forma de gel que actúa como tamiz molecular que discrimina los fragmentos por tamaños.

B.2 Se tiñe con 5 µl de bromuro de etidio que es un agente intercalante que se introduce entre las moléculas de ADN y emite fluorescencia cuando se irradia con luz ultravioleta.

B.3 Tampón electroforético 1X Tris, ácido Bórico y EDTA (TBE).

B.4 Marcador de tamaño conocido Phi X174/HaeIII (EUROBIO) que nos permite determinar el tamaño del fragmento de ADN amplificado.

B.5 Cubeta de electroforesis que se conecta a una fuente con un voltaje de 120 a 140 voltios durante 45 minutos aproximadamente.

## 1.1 Extragénicos

El **St-14** (DXS52) ha sido el marcador extragénico más utilizado en este trabajo de tesis y se encuentra a 2 centiMorgan (cM) (Unidad de recombinación genética) aproximadamente del locus del gen del *F8* (Oberlé *et al*, 1985). Se trata de un minisatélite o Variable number tandem repeat (VNTR) que es un ADN moderadamente repetitivo, de ahí que sea bastante útil para determinar el alelo portador. Al tratarse de un VNTR, la interpretación siempre se hace dentro de un contexto familiar, para poder observar la segregación de las repeticiones tanto del padre como de la madre pudiendo establecer un haplotipo de la familia en particular, los resultados serán unas bandas de diferentes tamaños dependiendo de los tandem *repeats* que tengan, este número de *repeats* se debe transmitir de forma conservada de padres a hijos. Existe de un 2-5% de riesgo que se produzca una recombinación entre el locus del St-14 y el gen del *F8*.

## 1.2 Intragénicos

Los más comúnmente usados han sido el RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) del intrón 18 (Peake *et al*, 1993) y los microsatélites (repeticiones dinucleotídicas) del intrón 13 y 22 (Lalloz *et al* 1991; 1994). En este trabajo de tesis se han identificado y puesto a punto tres nuevos marcadores microsatélites: el intrón 1, el intrón 9 y el intrón 25 (ver apartado de resultados pág.81 y 87).



El polimorfismo del intrón 18 se amplifica con una PCR obteniendo un fragmento de 142 pares de bases y se digiere directamente con la enzima de restricción *Bcl* que reconoce la siguiente diana T/GATCA dando lugar, a dos fragmentos de 99 y 43 pares de bases.

Para los microsatélites, la PCR de amplificación es fluorescente, en la que se utiliza uno de los cebadores marcado con un fluorocromo, después del análisis electroforético cogemos un microlitro del producto de PCR y le añadimos 5  $\mu$ l de agua destilada más 19  $\mu$ l de Hi-Di™ Formamida ( APPLIED BIOSYSTEMS) y 0.5  $\mu$ l de Rox™ Size Standard GeneSacn – 500 ( APPLIED BIOSYSTEMS) un marcador de tamaño estándar que está diseñado para tamaños de ADN comprendidos entre 35-500pb, las muestras se analizan en el *ABI PRISM* 3100 y 3130 con el software GeneMapper.

Los tres marcadores que se pusieron a punto en nuestro laboratorio: intrón 1, 9 e intrón 25, además de la PCR fluorescente, determinamos el rango de repeticiones que presentaban dichos microsatélites en la población española, para ello utilizamos 141 mujeres (282 cromosomas X) no relacionadas entre sí de la población general en el caso del estudio del intrón 1 y 100 mujeres no relacionadas entre sí, es decir estudiamos 200 cromosomas X de la población general para los intrones 9 y 25 y los analizamos por PCR y secuenciación directa.

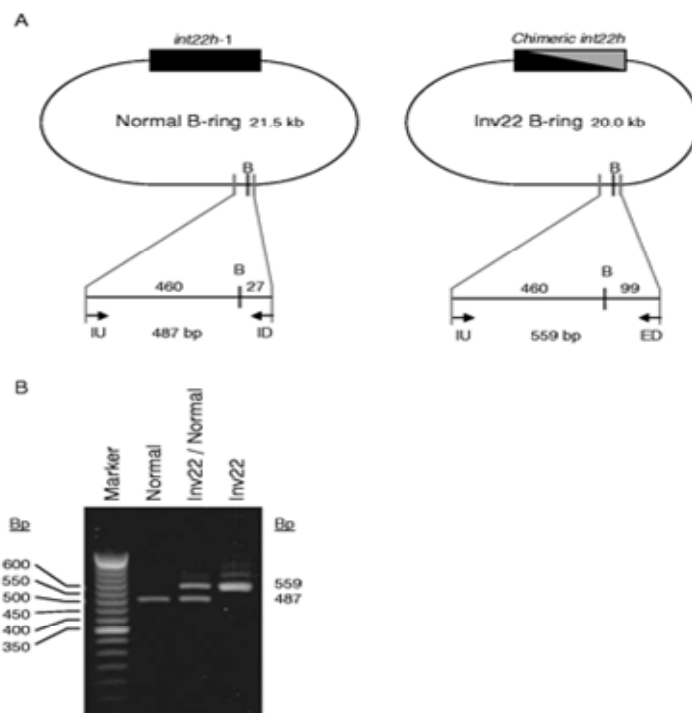
La PCR de amplificación se hizo como se especifica en los artículos obtenidos del trabajo de investigación de esta tesis (ver sección de resultados pág. 81 y 87). Después del análisis electroforético en gel de agarosa, purificamos el producto de PCR con un kit de purificación por columnas de Qiagen “*QIAquick column purification PCR kit*”, con esta purificación se elimina el exceso de nucleótidos y de cebadores de la reacción de PCR, del producto obtenido, se lleva a cabo una PCR de secuenciación, esta es una PCR asimétrica a partir de un solo cebador, para ella se usa un volumen final de 10  $\mu$ l que lleva 1  $\mu$ l de cebador forward o reverse según la cadena que vayamos a leer, 1  $\mu$ l del producto de PCR purificado, 1  $\mu$ l de BygDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) y 7  $\mu$ l de agua destilada, la reacción de PCR se realiza en un termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, INC.), el producto resultante se somete a una electroforesis capilar en el secuenciador automático 3100 *Avant Genetic Analyser* (Perkin Elmer –Applied Biosystem) cuyo software es el GenesCan 3.7 (ABI).

El rango de heterocigosidad esperada se calculó según la ecuación de Hardy-Weinberg:  $1-(p^2 + q^2 + r^2 \dots)$  donde p, q, r etc son las frecuencias de cada uno de los alelos, en algunos casos, este valor fue similar a la heterocigosidad obtenida que es la frecuencia media de los individuos heterocigotos.

## 2. ESTUDIO DIRECTO

### 2.1 Inversión del intrón 22.

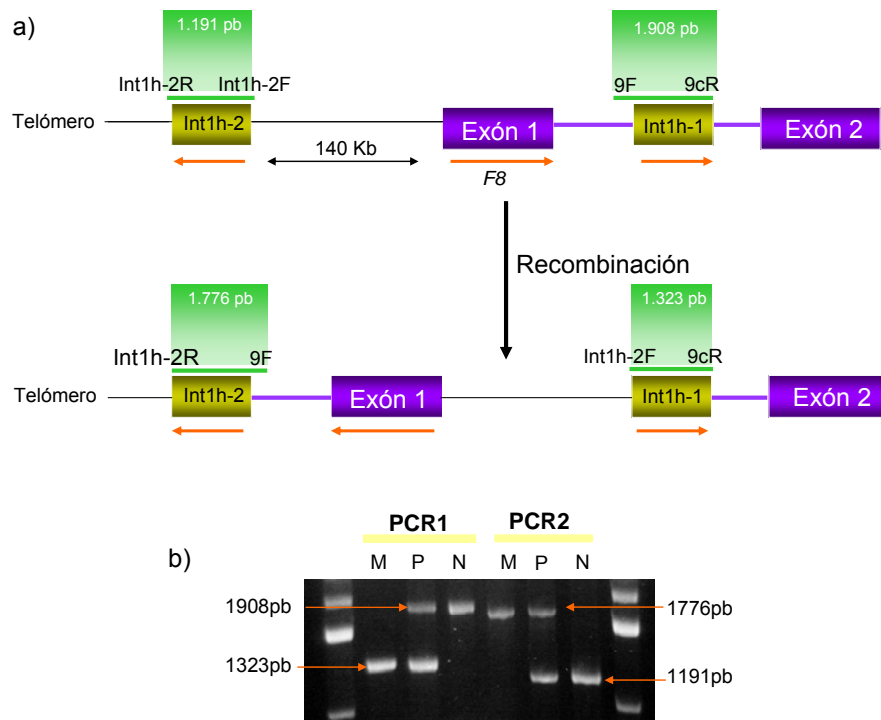
La detección de la inversión del Intrón 22, tradicionalmente se analizaba por Southern blot radioactivo (Lakich *et al* 1993) y posteriormente no radioactivo. Se han descrito algunos métodos de detección por Single-Tube PCR (Liu *et al*,1998) y Longe-range PCR (Bowen DJ.y Keeney S. 2003) más tarde se puso a punto el método de la PCR inversa (I-PCR) descrita por Rossetti *et al* 2005 para la detección de dicha inversión. Este método consta de tres pasos: A) primero se lleva a cabo una digestión con *Bcl*I B) el segundo paso es una ligación propia de los fragmentos de restricción dando lugar a anillos con el *Bcl*I incluido y por último, se realiza una PCR múltiplex usando un set de tres cebadores donde podemos obtener dos tamaños de amplificación, uno correspondiente a la inversión, cuyo tamaño es 559pb y otro de 487pb en el caso de no inversión (Figura 7).



**Figura 7. I-PCR para la detección de la inversión del intrón 22.** (Figura obtenida de Rossetti *et al.* 2005). **A)** esquema de los anillos formados después de la ligación con el *Bcl*I. El que presenta un tamaño de 21.5 kb (izquierda) es el que se corresponde con la no inversión y el del tamaño 20Kb (derecha) es el obtenido después de la recombinación. **B)** Análisis en gel de agarosa de la I-PCR. Existen tres posibles fenotipos, normal (2ª columna), mujer portadora (3ª columna) y afectado con la inversión del intrón 22 (4ª columna). La primera columna se corresponde con el marcador de tamaño.

## 2.2 Inversión del Intron 1

Se detecta mediante una PCR usando cuatro cebadores según la técnica descrita por Bagnall *et al* 2002 y modificada por Tizzano *et al.*, 2003 (Figura 8).



**Figura 8. a) Esquema de la región intrón 1 del gen *F8* normal y después de la recombinación homóloga.** Las flechas de color rojo indican la dirección de la transcripción. La región verde simboliza la zona amplificada. La pareja de *primers* utilizados son: Int1h-2R y Int1h-2F para la región *Int1h-2* y 9F, 9cR para la zona *Int1h-1* **b) Imagen de la electroforesis** después de las PCRs. Para la PCR1 se usaron los *primers* 9F, 9cR, Int1h-2F y para la PCR 2 los *primers* Int1h-2F; Int1h-2R y 9F. Los posibles genotipos son M= mutado; P= mujer portadora; N= normal

## 2.3 Determinación de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o inserciones.

El gen del *factor 8* consta de 26 exones, para el estudio de su secuencia y la de las zonas de unión intrón-exón, se han utilizado los cebadores descritos originalmente por David *et al.* (1994). Para el estudio de 1.9 kb de la región promotora se usaron los cebadores descritos en el artículo de Boekhorst *et al.*, 2005. Las condiciones de amplificación son similares a las descritas en estos trabajos con ligeras modificaciones (Tabla 4).

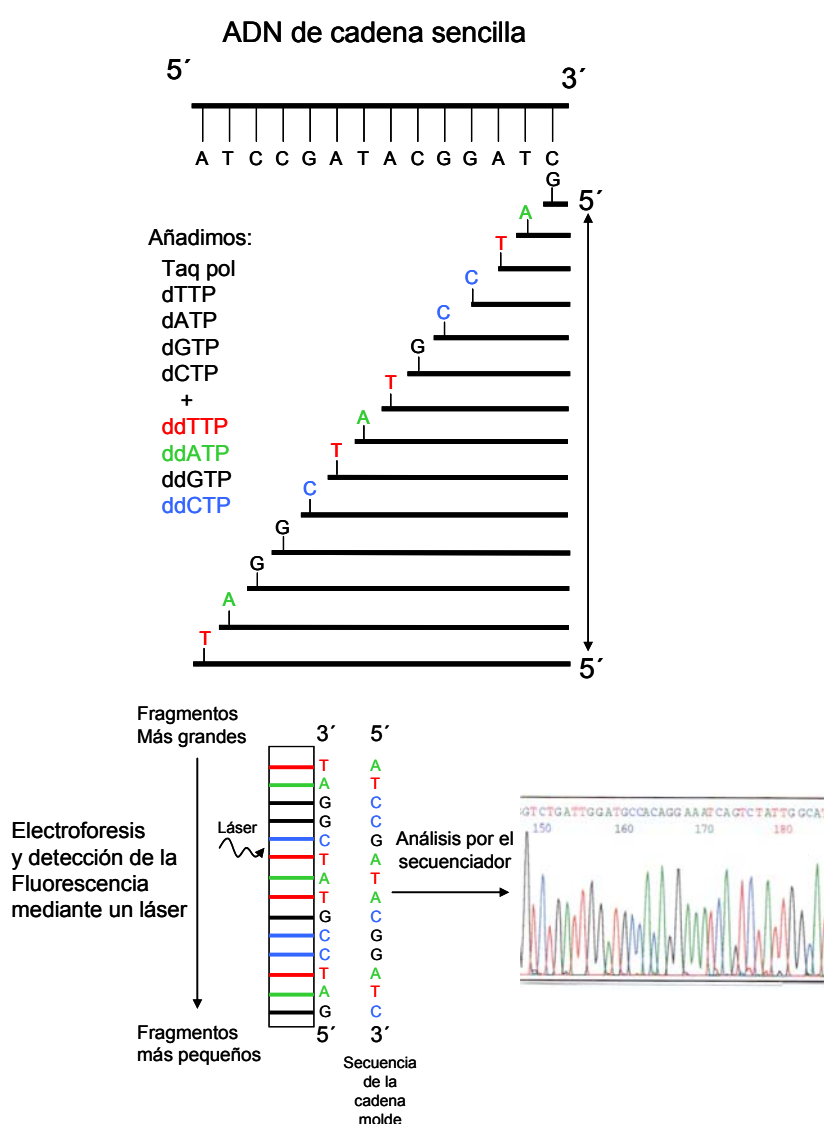
Exón	Tamaño	Secuencia 5' 3'	Condiciones de PCR		
			T°H	Ciclos	MgCl <sub>2</sub>
1	431 pb	AATCCTATCGGTTACTGCTTA AGCATCACAACCATCCTAAC	58°	30	2 mM
2	250 pb	TCAGGAGGTAGCACATACAT GTCCAATATCTGAAATCTGC	58°	30	1 mM
3	265 pb	TGCTTCTCCACTGTGACCT ATCTAGTAAATGTTAAGAAATACA	94° 50°	0.5°/cicloX19ciclos 1seg/cicloX19ciclos	1.5 mM
4	319 pb	GTACAGTGGATATAGAAAGGAC GATTCAGTTGTTTGTACTTCTC	58°	30	1.74 mM
5	295 pb	CTTACTGTCAAGTAACTGATG CTTCATTCTGAACAGTAATG	58°	30	1.74 mM
6	424 pb	TCCCACCTATTGTCATGGAC TACAGAACTCTGCTGCTGAA	58°	30	2 mM
7	420pb	GGCAAGAGCTGTTGGTTTG TGCCAGTAAATTTTATTAAGAGT	53°	30	1 mM
8	515pb	CCATATAGCCTGCAGAACAT CTGATGCTCAGCTATGTTAG	58°	30	2 mM
9	405pb	CTAACATAGCTGAGCATCAG AGATATGTCCATTGGAGACAA	94° 50°	0.5°/cicloX19ciclos 1seg/cicloX19ciclos	1.74 mM
10	400pb	CTAGCCTCAAATTAATAATG ACTTTAGACTGGAGCTTGAG	58°	30	1.5 mM
11*	581pb	GCGACTTTAGCTTCCACTTG GAGAGAGCTAAATCCAGAC	58°	30	2 mM
12	323pb	TGCCATCGCTTTCATCATAG CATTCAATATCTGGACATCAC	58°	30	1.5 mM
13*	501pb	GTCTCCTCACATTGGGATTG CAGAGGAGAACTAGATCCC	58°	30	2 mM
14A*	442 pb	ATCTGGGAATGGGAGAGAAC TAGGACTCTGTCGCAAGAGC	58°	30	2 mM
14B*	552 pb	GACATAGAGAAGACTGACCC AGACTCAGTAAGGGGAGATG	58°	30	2 mM
14C*	630 pb	TTCTTAGGACCCCAAGTA CCTTTGTATCCACCTTGCTG	58°	30	2 mM
14D*	600 pb	GAATAGTCCATCAGTCTGGC GTCACTGTATGTATCTGAGGC	58°	30	2 mM
14 E*	450 pb	AGTGGTAGTAGGAAAGGGTG CTGCTGGCTTGTATTAGGAG	58°	30	2 mM
14F*	550 pb	TATGACGGGGCATATGCTCC GTCTTGGAAATAGACCCTGG	58°	30	2 mM
14G*	530 pb	AAAGGGGCCATTACTCAGTC CTTAATCGCTCCCTCTGTTT	58°	30	2 mM
14H*	510 pb	ACACTGTTCTCCCGAAACCA ATGGCGTTTCAAGACTGGTG	58°	30	2 mM
14I*	540 pb	TTTGTCCCTGAACGCTTGTG TTGTCCTGATTCTCTACC	58°	30	2 mM

exón	Tamaño	Secuencia 5' 3'	Condiciones de PCR		
			TªH	Ciclos	MgCl <sub>2</sub>
15*	352pb	AGATGAAGTGGTAACTATGC GTGGGAATACATTATAGTCAG	58°	30	2 mM
16	525pb	AGCATCCATCTTCTGTACCA TCACTAGATTCCAGAATGACA	58°	30	1.74 mM
17	495pb	TGTCATTCTGGAATCTACTGA CACTCCCACAGATATACTCT	58°	30	1.5 mM
18	425pb	AGAGTATATCTGTGGGAGTG CTTAAGAGCATGGAGCTTGT	94° 50°	0.5°/cicloX19ciclos 1seg/cicloX19ciclos	1.5 mM
19	340pb	GCAAGCACTTTGCATTGAG GCAACCATTCCAGAAAGGA	58°	30	1.5 mM
20	300pb	ACGTTGAGTACAGTTCTTGG ACTAATAGAAGCATGGAGATG	58°	30	1.74 mM
21	168pb	GAATTTAATCTCTGATTTCTCTA GAGTGAATGTGATACATTTCC	94° 50°	0.5°/cicloX19ciclos 1seg/cicloX19ciclos	1.74 mM
22*	545pb	GGACACACCTGTAGCAATGT CCTCAAACCTAGGATATCC	58°	30	1.74 mM
23	360pb	GTCTTATGTAGATGTTGGATG AGTCTCAGGATAACTAGAACA	58°	30	2 mM
24	261pb	GCTCAGTATAACTGAGGCTG CTCTGAGTCAGTTAAACAGT	58°	30	1.74 mM
25	293pb	AGTGCTGTGGTATGGTTAAG TTGCTCTGAAAATTTGGTCATA	58°	30	1.5 mM
26	360pb	GGTTTAATCCTGGACTACTG GTGTCTGCTAGGATTTAGCA	58°	30	1.74 mM
<b>Región Promotora (1.9Kb)</b>					
Promotor 1 Promotor 2	507pb	AAATGCCAGGTGGTTATGAGT CTGCTGCCAGTATGAGGAATT	55°	30	4mM
Promotor 3 Promotor 4	449pb	TCTGAGAAGAGGAGTGACAGGA CTAAGCAGTAACCGATAGGATTG	60°	30	4mM

**Tabla 4. Condiciones de PCR** y secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen del *factor 8* y de su región promotora. Los exones con asterisco (\*) están modificados en este trabajo de tesis.

Los pasos siguientes a la PCR de amplificación son:

- 1) El producto resultado de la amplificación se siembra en un gel de agarosa al 1.5%, teñida con 5µl de bromuro de etidio para la comprobación del producto de amplificación.
- 2) Purificación del producto de amplificación con un Kit por columnas "QIAquick column purification PCR-Kit" (Qiagen).
- 3) PCR de secuenciación por el método enzimático de Sanger *et al*, 1977, a partir de ADN de cadena sencilla y un único cebador complementario a la cadena molde usando el kit de secuenciación de DNA Perkin Elmer-Applied Biosystems en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems) (Figura 9).



**Figura 9. PCR de secuenciación.** La principal característica es la utilización de dideoxynucleótidos (ddNTPs), el cual una vez incorporado se interrumpe la síntesis de ADN. Cada ddNTP va marcado con un fluorocromo de diferente color. La polimerasa va incorporando nucleótidos dNTP hasta que por azar se incorpora un ddNTP. La reacción se somete a electroforesis capilar en el secuenciador automático donde las moléculas se ordenan por medida de mayor a menor y son estimuladas por un láser, la emisión de color es detectada por el secuenciador que lo traduce por la base nitrogenada que le corresponde.

## 2.4 Confirmación que los cambios encontrados de un aminoácido por otro son patológicos.

Algunos de los cambios encontrados en este trabajo de tesis (ver sección de resultados pág. 103) no estaban descritos en la base de datos de la hemofilia A (HAMSTeRS) ni en la bibliografía, de ahí que fuera necesario comprobar que las mutaciones *missense* eran realmente las causantes de la HA en las familias que las presentaban. La comprobación incluyó:

(a) que el cambio co-segregara con otros individuos afectados o con mujeres portadoras de la familia,

(b) que no hubiera otros cambios en otras regiones del gen del *F8*,

(c) que dicho cambio no estuviera presente en la población general.

Para este último punto se estudiaron 100 individuos varones de la población general no emparentados entre sí. Se amplificó la región de estudio en cada uno de ellos, es decir, el exón donde se había identificado el cambio, mediante PCR. Para cada uno de los cambios encontrados, se identificó una enzima de restricción utilizando el programa Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>), que cortara en el nucleótido original o en el mutado. Una vez establecido el criterio de actuación y el número y tamaño de los fragmentos que obtendría después de la digestión, se pasó a digerir los productos de PCR con las enzimas siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Para analizar los resultados se usó la técnica de detección y separación de pequeños fragmentos de ADN, en el sistema de electroforesis Genephor<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences). Además,

(d) se verificó el carácter de la sustitución, atendiendo a criterios como por ejemplo si era conservativa o no, a partir de un alineamiento múltiple de los factores V y VIII, así como de la ceruloplasmina en diferentes especies. Posteriormente, se analizó el impacto de las mutaciones *missense* utilizando un modelo de la estructura tridimensional del FVIIIa generado con el programa Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>). En general, pudimos establecer una relación clara entre el carácter de la sustitución y el fenotipo observado, donde las sustituciones conservativas conducen comúnmente a un fenotipo leve o moderado, mientras que las no conservativas están asociadas con un fenotipo severo. Finalmente, se predijo el impacto de estos cambios puntuales sobre la estabilidad del factor VIII activo, comparándolos con las posiciones equivalentes en el FVai y la ceruloplasmina; este análisis se realizó con los programas Polyphen y CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de/>) (Parthiban *et al* 2006).

El análisis bioinformático sobre el impacto de las mutaciones en la estructura del FVIII se realizó en colaboración con el Dr. Pablo Fuentes-Prior de la Unitat Bases Moleculares de les Malalties del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

## 2.5 Detección de grandes deleciones o duplicaciones mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (*Quantitative Real time polymerase Chain Reaction*)

Cuando un paciente no amplifica algún exón (o exones) determinados, el diagnóstico de portadoras se hace más complejo dado que el cromosoma X normal enmascara la deleción en una PCR cualitativa. Sin embargo la PCR cuantitativa permite el seguimiento de la cinética de amplificación del fragmento de ADN en tiempo real, al existir una relación lineal entre el número de ciclos necesarios para detectar la fluorescencia de amplificación y la concentración de ADN diana de la muestra, pudiendo determinar la dosis génica de cada exón, permitiendo definir que mujeres son portadoras de dicha deleción. Esta técnica es rápida y sencilla, con una elevada especificidad, reproductibilidad y sensibilidad, y donde las posibilidades de contaminación son mínimas.

La cuantificación se realiza en un analizador LightCycler® 1.5 por un método basado en la fluorescencia y canales de detección (Figura 10), es un termociclador que lleva incorporado un fluorímetro que detecta la fluorescencia emitida a una longitud de onda de 530,640 y 705 nm, el fluorocromo utilizado en nuestro caso, es el SYBRGreen I cuya lectura se hace a 530 nm. Este fluorocromo se intercala entre el ADN de doble cadena (dsADN).

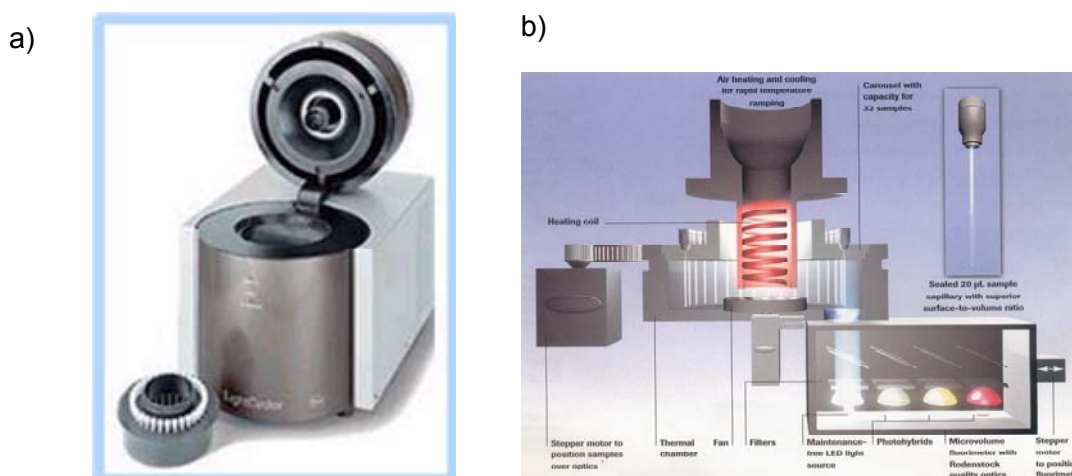
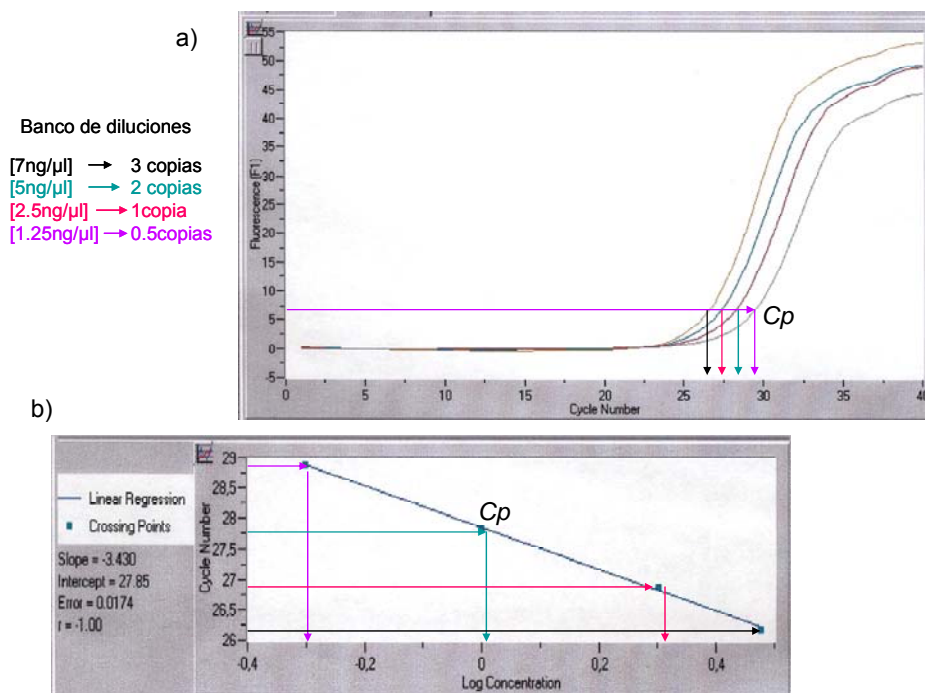


Figura 10: Cuantificación de dosis génica por un método basado en la fluorescencia y canales de detección. a.) Termociclador LightCycler® 1.5 b) Fluorímetro



La intensidad de luz emitida varía en las distintas etapas de la PCR, siendo la de máxima intensidad al final de la fase de elongación, donde todo el ADN es de cadena doble, al final de cada fase de elongación se mide la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de producto de PCR que se está formando. A través del LightCycler® software 3.5.3 con el método de la segunda derivada, se analizan los datos obtenidos para obtener las cuantificaciones absolutas. El kit utilizado en nuestro trabajo de laboratorio es el *FastStart DNA Master SYBRGreen I*™ (ROCHE).

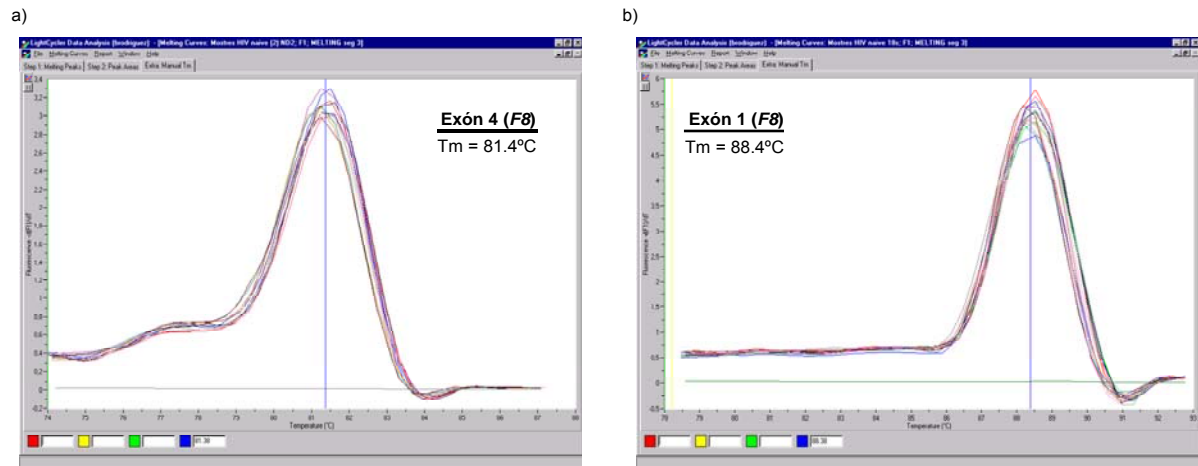
El valor que interesa obtener es el *crossing point* ( $C_p$ ) que corresponden al número de ciclos de amplificación necesarios para que pueda empezar a detectarse fluorescencia, cuanto mayor cantidad de ADN inicial haya, más pequeño será el valor del  $C_p$ . Este valor nos permite determinar la recta patrón donde el valor del  $C_p$  es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de ADN (Figura 11).



**Figura 11. Distintos valores de *Crossing point* ( $C_p$ ) para un banco de diluciones de ADN conocido. a)** esta figura nos muestra el número de ciclos necesarios a partir del cual se puede detectar fluorescencia en cada una de las muestras, cuanto mayor es la concentración antes se detecta. **b)** A partir de los valores del  $C_p$  extrapolados a la ecuación de la recta se puede determinar la concentración inicial de ADN de cada una de las muestra problema.

A partir de la ecuación de la recta y extrapolando el valor del  $C_p$  para cada muestra podemos determinar la cantidad de ADN inicial que hay en cada una de ellas. Después de la amplificación se procede a la detección específica de los productos de la PCR mediante el

análisis de la curva de fusión o temperatura de *melting* ( $T_m$ ) que es específica para cada fragmento de ADN. (Figura 12).



**Figura 12. Gráfica de la Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) para dos exones distintos del gen del F8.** Para determinar la  $T_m$  de los fragmentos amplificados, el programa informático va aumentando la temperatura de forma constante, de manera que el ADN de doble cadena se va desnaturalizando y se convierte en ADN de cadena simple. En este momento el fluorocromo se libera y la fluorescencia disminuye. De la gráfica de disminución de la fluorescencia respecto al aumento de temperatura y tras una conversión matemática se obtienen estas gráficas. La temperatura de *melting* es específica de cada fragmento de ADN. **a)** Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) del exón 4 del gen del F8. **b)** Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) del exón 1 del gen del F8.

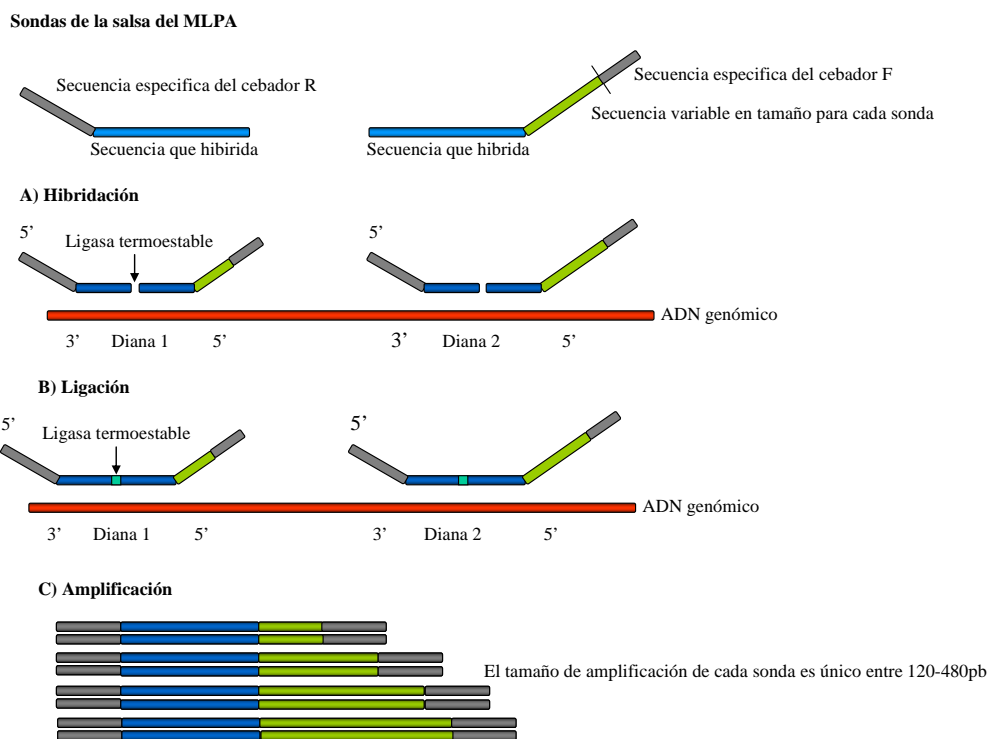
Para poder llevar a cabo esta técnica es importante que la concentración de las muestras utilizada sea la misma y que estén disueltas en el mismo eluyente, en nuestro caso 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA (ver lectura del ADN en el punto siguiente). Esta es la clave para poder relacionar una concentración a un número determinado de copias del gen.

En las familias estudiadas siempre utilizamos un control externo de una mujer sana con una dosis génica conocida (2 copias) y un control interno que es cualquier otro exón que no presenta delección del gen (todas las condiciones y cebadores utilizados en la PCR a tiempo real están descritos en materiales y métodos de dos de los artículos de esta tesis, ver sección de resultados pág. 123 y 129).

## 2.6 Detección de grandes delecciones o duplicaciones mediante la técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

Una de las metodologías de reciente aparición que cada vez se está utilizando más para la determinación de grandes delecciones y duplicaciones es la técnica del MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (Acquila et al 2008).

La técnica de MLPA se basa en una PCR donde se pueden amplificar 45 secuencias específicas de forma simultánea. La diferencia con la PCR múltiplex convencional es que, en el MLPA solo se usa una pareja de cebadores, lo que da más robustez a la técnica. El diseño de las sondas específicas a la secuencia diana, es la base de la técnica. Estas sondas están constituidas por dos oligonucleótidos que hibridan *en tándem* con la secuencia diana. Cada uno de ellos consta de una secuencia de hibridación complementaria a la región diana, una secuencia de relleno para dar los distintos tamaños a los diferentes fragmentos obtenidos de la hibridación con las sondas y finalmente la secuencia de los cebadores para su posterior amplificación (Figura 13).



**Figura 13. Reacción de MLPA.** Imagen modificada de MRC-Holland. Los tres pasos previos a la electroforesis y análisis de datos. A) Hibridación, B) Ligación, C) PCR de Amplificación

El MLPA se lleva a cabo a partir de ADN genómico purificado extraído a partir de linfocitos de sangre periférica por el método salino, aunque esta técnica es bastante reproducible, el tratamiento de dichas muestras puede afectar al patrón de picos del MLPA, por ello, es importante que todas las muestras utilizadas en un experimento sean obtenidas del mismo tejido, extraídas por el mismo método, en el mismo laboratorio y que estén a la misma concentración.

### 2.6.1. Lectura del ADN

Diluimos las muestras de ADN a 20 ng/ $\mu$ l con TE (10 mM Tris-HCl pH 8.2, 0.1 mM EDTA) para comprobar que la pureza y la concentración es la misma en todas las muestras, hacemos dos lecturas en un espectrofotómetro: a una densidad óptica (DO) de 260 nm (DO260), que corresponde al ADN bicatenario presente en la muestra y otra lectura, a DO de 280 nm (DO280) que corresponde a la concentración de proteínas contaminantes. La pureza de la muestra viene dada por la relación

$$DO260/DO280$$

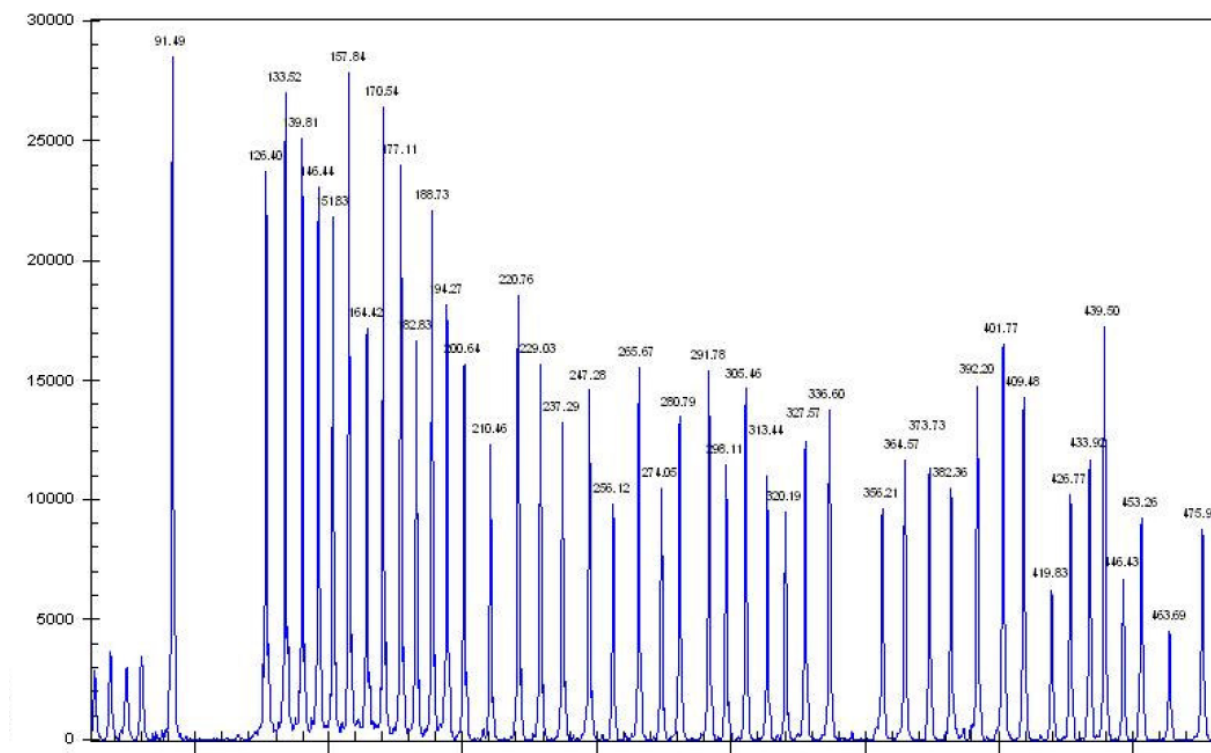
y tiene que estar comprendida entre 1.6 y 2. Una relación inferior a 1.6 indica contaminación de proteínas, mientras que valores superiores a 2 indicarían contaminación por sales.

La concentración de ADN se calcula mediante la lectura a DO260, teniendo en cuenta la dilución realizada en la muestra y el coeficiente de extinción molar del ADN bicatenario (50).

$$\mu\text{l/ml de ADN} = DO260 \times 50 \times \text{dilución}$$

Para la detección y cuantificación de ADN por la técnica de MLPA son necesarios 5 pasos, una vez tenemos todas las muestras diluidas y con una concentración conocida. Los pasos a seguir son los siguientes: 1º desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas contenidas en la *SALSA* correspondiente, en el caso de la HA es la *SALSA MLPA P178 FVIII probemix*, el 2º paso consiste en una reacción de ligación, el 3er paso es una PCR de amplificación, el 4º consiste en la separación del producto amplificado por electroforesis y por último, el 5º paso, es el análisis de los datos. (Los detalles y condiciones de cada una de las fases se pueden obtener en la página web [www.mrc-holland.com](http://www.mrc-holland.com) en la sección de detección y cuantificación de ADN por MLPA).

El último paso antes del análisis de resultados, que consiste en la separación de los productos de amplificación por electroforesis (figura 14), en nuestro laboratorio se realizaron en un secuenciador automático ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, utilizando como marcador de tamaño el Rox 500.



**Figura 14. Patrón de separación por electroforesis capilar del producto de amplificación del gen *F8* con la salsa MLPA P178 FVIII**

El fundamento metodológico de dicha técnica se basa en una desnaturalización del ADN problema, hibridación de las sondas, ligación de los dos oligonucleótidos ya hibridados situados en *tándem* que forman cada sonda y amplificación por PCR. Por último se separan los distintos fragmentos amplificados (120-480 pb) mediante electroforesis y se realiza el análisis oportuno mediante cálculos de normalización. En hemofilia A, el kit utilizado es la *SALSA MLPA P178 FVIII probemix* que está formado por 45 sondas, de las cuales, 33 son específicas del gen *F8* y de las 12 sondas control restantes, 11 están distribuidas en otros locus del cromosoma X y una en el cromosoma dos (Tabla 5).

Para poder realizar el experimento se utilizará ADN genómico purificado, extraído a partir de linfocitos de sangre periférica por método salino de: individuos control, tanto de hombres como de mujeres para poder normalizar los pacientes por separado, puesto que es una enfermedad ligada al cromosoma X y los valores de cuantificación del gen son diferentes, y ADN de individuos problema tanto portadoras como afectados de HA. Como control interno de la técnica también utilizaremos ADN de muestras que sabemos que presentan alguna deleción para comprobar la sensibilidad de la metodología, una vez tengamos los resultados, los nuevos hallazgos como nuevas deleciones o inserciones, se cotejarían con

otra técnica alternativa como la PCR cuantitativa a tiempo real para validar la técnica del MLPA.

El análisis de datos se llevó a cabo mediante un cálculo de normalización manual, para ello primero exportamos a una hoja de Excel, las áreas y los tamaños de los picos obtenidos. Los productos no específicos de la amplificación, los picos debidos a dímeros de los *primers* y los picos generados por la MLPA control mix, se pueden eliminar debido a la baja área del pico y/o longitudes pequeñas.

Primero se suma el área de todas las sondas control del individuo que estamos estudiando, sea un individuo control o problema, la primera normalización se obtiene de dividir cada área de cada sonda de ese mismo paciente, entre la suma de las áreas control de dicho individuo, después hacemos el promedio de cada una de las sondas de cada uno de los individuos control, la segunda normalización se obtendría de dividir la primera normalización entre el promedio de cada sonda de cada individuo control por último calculamos la desviación estándar de cada una de las sondas control de cada individuo, este valor tiene que estar por debajo del 10%.

Tamaño(nt)	Posición en el cromosoma		Sitio de ligación NM_000132.2	Secuencia parcial al sitio de ligación
	Control	Factor VIII (Exón)		
64-70-76-82*				
92	2q14			
130	Xq11.2			
136	Xq28			
142		Exón 1	24-25	ACATCCAGTG-GGTAAAGTTC
148		Exón 7	1132-1133	CTCTTGATGG-ACCTTGACACA
154		Exón 14	5111-5112	CCTGGGCAAA-GCAAGGTAGG
160		Exón 20	6308-6309	CCCTGGGAAT-GGCTTCTGGA
166	Xq27			
172		Exón 2	346-347	TCTTTTCCAT-TCAACACCTC
178		Exón 6	891-892	GGATAGGGAT-GCTGCATCTG
184		Exón 14	3577-3578	GGAAAGAACT-CTCTGAACTC
190		Exón 21	6405-6406	CGGATCAATC-AATGCCTGGA
196	Xp22			
202		Exón 1	294-295	TGATCTCGGT-GAGCTGCCTG
211		Exón 9	1566-1567	GCATGAATCA-GGAATCTTGG
221		Exón 5	779-780	CAGGGAGTCT-GGCCAAGGAA
229		Exón 26	8714-8715	TGGAAACTAT-AACATAGCTG
238	Xq26			
248		Exón 7	984-985	CAGGAAATCA-GTCTATTGGC

Tamaño (nt)	Posición en el cromosoma		Sitio de ligación NM_000132.2	Secuencia parcial al sitio de ligación
	Control	Factor VIII (Exón)		
256		Exón 10	1659-1660	CATCTACCCT-CACGGAATCA
266		Exón 15	5431-5432	AAAGTTGTTT-TCCAGGAATT
274		Exón 12	2063-2062(antisentido)	TGCATGATGT-TGGAGGCTTG
281	Xq13			
292	Xp22			
298		Exón 4	689-690	CACTGTCCT-TACCTACTCA
305		Exón 11	1830-1831	CTATTACTCT-AGTTTCGTTA
313		Exón 13	2163-2164	TGGAGCACAG-ACTGACTTCC
320		Exón 16	5587-5588	TCCTTCTATT-CTAGCCTTAT
328		Exón 23	6637-6638	GGGATAAAAC-ACAATATTTT
337	Xq28			
356		Exón 12	1975-1976	GATGAGAACC-GAAGCTGGTA
364		Exón 17	5818-5819	AACACACTGA-ACCCTGCTCA
373		Exón 24	6782-6783	GTAAAGCAAT-ATCAGATGCA
382	Xq23			
393		Exón 22	6572-6571(antisentido)	TTTCCTCGAT-AAGTCTGCCA
401		Exón 13	2163-2164	TGGAGCACAG-ACTGACTTCC
409		Exón 18	6073-6074	AGCATGGGCA-GCAATGAAAA
419		Exón 25	6923-6924	GGCTGCAAGT-GGACTTCCAG
427		Exón 8	1213-1214	GTAGACAGCT-GTCCAGAGGA
434	Xq21			
439		Exón 3	462-463	CATCCAGGCT-GAGGTTTATG
446		Exón 14	2655-2656	TGATCTCCAA-GAAGCCAAAT
454		Exón 19	6226-6227	CGGGTGGAAAT-GCCTTATTGG
463		Exón 26	7104-7105	CTTCACACCT-GTGGTGAAC
476	Xp21			

**Tabla 5. SALSA MLPA P178 FVIII probemix**

## **VI. RESULTADOS**





## **1. DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS MARCADORES EN EL GEN F8 DE LA COAGULACIÓN**

Este apartado hace referencia a los resultados obtenidos del estudio de nuevos marcadores en el gen *F8*.



UTILITY OF A (GT)*n* DINUCLEOTIDE REPEAT IN INTRON 1 OF THE FACTOR 8 GENE  
FOR HAEMOPHILIA A CARRIER DIAGNOSIS

*HAEMOPHILIA.*

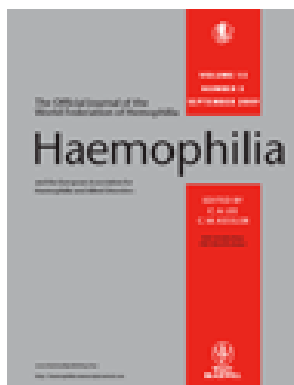
2005, 1; 142-144

E. Tizzano, A. Venceslá, M. Cornet, M. Baena and M. Baiget

Síntesis del estudio:

Con este trabajo se demuestra la importancia que tiene el aportar nuevos marcadores intragénicos en el estudio indirecto del gen *F8* para caracterizar el cromosoma portador de la patología molecular, esto facilita la determinación del estatus de portadoras.

En este estudio en concreto, el marcador nuevo incorporado al trabajo de rutina del laboratorio fue el dinucleótido (GT)*n* localizado dentro del intrón 1 del gen *factor 8*. En nuestra población encontramos hasta seis alelos diferentes (de 15 a 20 repeticiones). Con este marcador se resolvieron 19 de 47 mujeres y sus respectivas familias que no eran informativas para el resto de marcadores utilizados hasta el momento.





## Utility of a (GT)<sub>n</sub> dinucleotide repeat in intron 1 of the factor 8 gene for haemophilia A carrier diagnosis

E. TIZZANO, A. VENCESLÁ, M. CORNET, M. BAENA and M. BAIGET  
Department of Genetics, Hospital of Sant Pau, Barcelona, Spain

**Summary.** We report the usefulness of a dinucleotide GT repeat in intron 1 of the factor 8 gene in carrier diagnosis of haemophilia A (HA). We analyzed 47 women from HA families in which the mutation was not identified in the index case and in which the common intragenic polymorphic markers were uninformative. The intron 1 GT repeat was useful to identify the X chromosome with the mutation in 19

of them. The analysis of this easily detectable marker in conjunction with other current markers may facilitate X chromosome identification in a large proportion of HA families.

**Keywords:** carrier diagnosis, gene tracking, GT dinucleotide repeat, haemophilia A, intron 1

### Introduction

The first line of diagnosis in haemophilia A (HA) is to identify two common factor 8 (F8) gene inversions in intron 22 and intron 1 [1,2] which can be detected in approximately 50% of the severe patients. The remaining mutations are heterogeneous and are widespread within the factor 8 (F8) gene. For patients without gene inversions, direct diagnosis will be based upon screening methods in combination with sequencing to identify subtle gene mutations. Despite the availability of improved screening strategies for point mutations, carrier status and prenatal diagnosis still heavily rely on gene tracking using the polymorphic intragenic DNA markers, especially in families whose affected members are not available.

PCR techniques allow the speedy detection of two GT dinucleotide repeat markers in intron 13 and intron 22 [3] and the DNA dimorphisms for restriction enzyme *BclI* in intron 18 [4]. Together with a previous *XbaI* RFLP marker in intron 22 [5], these markers are helpful in identifying the X chromosome bearing the mutation in a given family [6,7]. How-

ever, after the testing of these four markers, a number of families remain uninformative. Other polymorphic markers have been described [6,8], although their utility and applicability in an extended population of HA families have not been addressed.

We present a detailed description of a polymorphic dinucleotide GT repeat in intron 1 of the F8 gene and a simple working protocol for its detection. The study of this marker improved haplotype analysis in the detection of haemophilia A carriers.

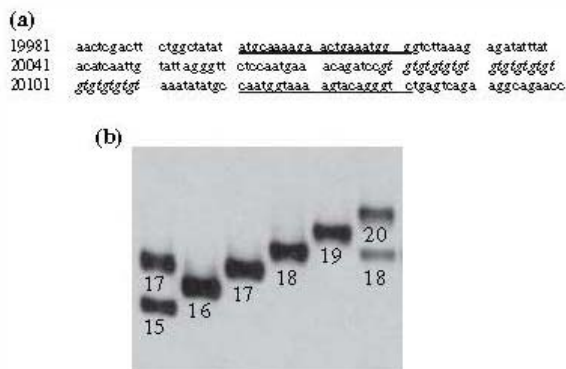
### Patients, materials and methods

From our pool of possible HA carriers under study, 47 proved to be uninformative for the four intragenic markers routinely used in our laboratory and were further analysed for the intron 1 repeat. In addition, 141 women from a random population were tested to define the allele frequencies and to calculate heterozygosity. For multi-allele polymorphisms, the heterozygosity rate was calculated in accordance with the Hardy–Weinberg equation as  $1 - (p^2 + q^2 + r^2 + \dots)$  where  $p, q, r, \dots$  etc. are allele frequencies.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood by the salting-out method as previously described [9]. Markers Intron 13 CA repeat, Intron 22 CA repeat, *BclI* at intron 18 and *XbaI* RFLP at intron 22 were performed as previously described [3,6,7]. The intron 1 is one of the largest introns in the F8 gene with almost 23 000 base pairs. The GT repeat was

Correspondence: Eduardo F. Tizzano, MD, PhD, Department of Genetics, Hospital of Sant Pau Padre Claret 167, 08025, Barcelona, Spain.  
Tel.: +34 93 2919361; fax: +34 93 2919494;  
e-mail: etizzano@hsp.santpau.es

Accepted after revision 17 December 2004



**Fig. 1.** (a) Sequence of the intron 1 region encompassing the GT repeat (italics) and the primers used for detection (underlined). Numbers in the left correspond to the numbering of the available factor 8 sequence (GenBank accession no. NT025965). (b) Fragments of different size detected in our population under study. The numbers below represents repeat sizes.

identified at the end of the intron 1 starting at nucleotide 20 080 from the complete F8 sequence available (GenBank accession no. NT025965). For the intron 1 GT repeat procedure, DNA was amplified using INT1 forward primer 5'-ATGCA-AAAGAACTGAAATGGG-3' and INT1 reverse primer 5'-GAC CCTGTACTTTTTACCATTG (Fig. 1a). The reaction was performed in 25  $\mu$ L volume with 0.2 mM of each of the four dNTPs, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M of each primer, 250 ng of DNA and 0.25 U Taq Polymerase and it was subjected for 2 min at 94 °C and to 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C and 30 s at 72 °C, with a final extension step of 5 min at 72 °C. PCR products of approximately 140 bp (depending on the number of GT repeats) (Fig. 1b) were separated on a 6% polyacrilamide-8 M urea gel (45 cm long and 0.5 mm thick). Samples were electrophoresed for 5 h at 1700 V, transferred to a nylon membrane (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences, Parc Tecnològic del Vallés, Cerdanyola, Spain), oven hybridised with a 40 bp CA-labelled oligonucleotide probe and visualised by an enhanced chemiluminescence method (ECL; Amersham). To identify alleles, the exact number of GT repeats was determined by direct sequencing of the fragment. PCR products from four patients homozygous for alleles with different size fragments (Fig. 1b) were purified with a QIA quick column PCR purification kit (QIAGEN), and analysed by direct forward and reverse sequencing, using a DNA sequencing kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Tres Cantos, Madrid, Spain) on a 3100 Avant Genetic Analyser.

## Results

### *Allele frequency and heterozygosity*

Two hundred and eighty-two X chromosomes from 141 women showed that the most abundant allele was (GT)<sub>16</sub> followed by (GT)<sub>17,18</sub> and <sub>19</sub> alleles. Fifteen or 20 repeats were found only twice. The frequency of these alleles was estimated to be 1.4% for (GT)<sub>15</sub>, 62% for (GT)<sub>16</sub>, 22% for (GT)<sub>17</sub>, 7% for (GT)<sub>18</sub>, 5.7% for (GT)<sub>19</sub> and 1.4% for (GT)<sub>20</sub>. The expected heterozygosity was 0.56. Given that 60 out of 141 women were found to be heterozygous for the marker, the observed heterozygosity was 0.42 in 282 chromosomes.

### *X chromosome identification in previous uninformative carriers*

From the 47 carriers under study who were uninformative for the four common intragenic markers, 19 (40%) were heterozygous for the intron 1 marker, allowing the identification of the X chromosome in their respective families. We were not able to detect a clear allelic association with the remaining markers.

## Discussion

In many laboratories, carrier detection and prenatal testing in HA are accomplished with polymorphic intragenic DNA markers. Despite the availability of improved screening strategies, point mutation detection is still a daunting prospect. Moreover, there are some situations in which the use of indirect strategies is the sole option, e.g. when the mutation is not detected in a patient after inversion screening and a complete sequencing of the gene [10]. When the affected members are unavailable for testing, an exclusion diagnosis could be performed with markers, depending on the availability of healthy males of the family. Moreover, large deletions represent approximately 5% of severe patients and have been detected in males, though they still constitute a challenge in females. In practice, carrier diagnosis in such cases are resolved by gene tracking of the X chromosome bearing the F8 mutation by marker analysis. In contrast, the shortcomings of the marker approach include the non-availability of clue members of a given family to complete the gene tracking and the lack of informativity from markers. This latter complex situation of HA carrier diagnosis can be circumvented with the use of new DNA markers. The intron 1 (GT)<sub>n</sub> repeat has been previously reported in an abstract together with a (TC)<sub>n</sub> in

intron 9 of the F8 gene by Dardik *et al.* [11]. These authors apparently found three alleles varying from 14 to 16 repeats. By contrast, we detected at least six alleles rendering the intron 1 polymorphism more useful for marker analysis in our HA carrier and prenatal diagnoses. Our protocol includes the blotting and use of a CA probe to clearly detect the different alleles. Alternatively, a simpler protocol by gel electrophoresis and staining would be preferable for some laboratories. However, in our experience, with the latter approach, the allele discrimination is not so straightforward with the result that interpretation can be difficult in some families.

The identification of the at-risk X chromosome by means of the known DNA markers within the F8 gene is usually limited to a number of carriers. The application of the intron 1 (GT)<sub>n</sub> repeat allowed the identification of the X chromosome in 40% of previously uninformative carriers under study. Moreover, the cumulative informativeness of the various intragenic markers used commonly in HA can be substantially increased by the addition of the intron 1 repeat. At present we have tested more than 150 HA families in which the molecular defect was identified with the intron 1 marker and we found a complete segregation with the F8 gene mutation including carrier and prenatal diagnoses. This reliability, together with the acceptable rate for heterozygosity and the accessible protocol of detection, renders this marker useful in facilitating X chromosome identification in a large proportion of HA families.

## References

- 1 Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M *et al.* Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an International Consortium study. *Blood* 1995; **86**: 2206–12.
- 2 Bagnall RD, Waseem N, Green P, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood* 2002; **99**: 168–74.
- 3 Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG. Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematol* 1994; **86**: 804–9.
- 4 Gitschier J, Drayna D, Tuddenham EG, White RL, Lawn RM. Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a *BclI* polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* 1985; **314**: 738–40.
- 5 Chan V, Tong TM, Chan TP *et al.* Multiple *XbaI* polymorphisms for carrier detection and prenatal diagnosis of haemophilia A. *Br J Haematol* 1989; **73**: 497–500.
- 6 Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V *et al.* Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; **4**: 313–44.
- 7 Tizzano EF, Domènech M, Baiget M. Inversion of the intron 22 in isolated cases of hemophilia A. *Thromb Haemost* 1995; **73**: 6–9.
- 8 Lin SR, Lin SW, Hsu YC, Shen MC. Identification of a new CA dinucleotide repeat in the human factor VIII gene. *Br J Haematol* 2000; **111**: 1256–9.
- 9 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1989; **6**: 1215.
- 10 Klopp N, Oldenburg J, Uen C, Schneppenheim R, Graw J. 11 hemophilia A patients without mutations in the factor VIII encoding gene. *Thromb Haemost* 2002; **88**: 357–60.
- 11 Dardik R, Kenet G, Kornbrot N, Rosenberg N, Martinowitz U. Two novel polymorphic microsatellite markers in the FVIII gene useful in haemophilia A diagnosis. *Haemophilia* 2002; **8**: 567–568.





APPLICATION OF INTRON 9 AND INTRON 25 DINUCLEOTIDE REPEAT OF THE FACTOR VIII GENE FOR CARRIER DIAGNOSIS IN HAEMOPHILIA A.

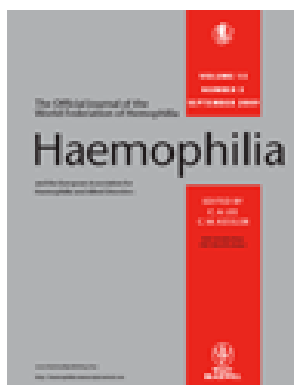
*HAEMOPHILIA.*

2008; 14: 489-493

A. Venceslá, M. Baena, L. Fares Taie, M. Cornet, M. Baiget and E. Tizzano

Síntesis del estudio:

Siguiendo con el estudio de marcadores para la identificación del cromosoma de riesgo para la hemofilia A, como resultado del trabajo realizado, surgió otro artículo con dos nuevos marcadores polimórficos intragénicos: el dinucleótido (TC/GA)<sub>n</sub> en el intrón 9 y el dinucleótido (GT/AC)<sub>n</sub> en el intrón 25. Gracias a la incorporación de estos dos nuevos marcadores, la informatividad acumulada aumento hasta un 91% en nuestras portadoras en estudio.





ORIGINAL ARTICLE *Laboratory investigation*

# Application of intron 9 and intron 25 dinucleotide repeats of the factor VIII gene for carrier diagnosis in haemophilia A

A. VENCESLÁ, M. BAENA, L. FARES TAIE, M. CORNET, M. BAIGET and E. F. TIZZANO

*Department of Genetics and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, University Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain*

**Summary.** We describe the usefulness of two dinucleotide repeats located in intron 9 and in intron 25 of the factor VIII gene for carrier diagnosis of haemophilia A. We analyzed 100 unrelated Spanish women and 34 women from haemophilia A (HA) families in whom known intragenic markers were unhelpful in determining their carrier status. The heterozygosity rate of intron 9 and intron 25 markers in the 100 control women was lower (0.28 and 0.38, respectively) than the values obtained with common markers routinely used in our laboratory. However, the application of intron

9 and intron 25 markers was effective in identifying the at-risk X chromosome in 11 of 34 (32%) of the uninformative women from HA families. The combined use of these repeats with current markers may facilitate the identification of the X chromosome in HA families for application in carrier, prenatal and pre-implantation diagnoses.

**Keywords:** carrier diagnosis, haemophilia A, heterozygosity rate, intron 25 GT/AC repeat, intron 9 TC/GA repeat, prenatal testing

## Introduction

Despite the rapid advances in molecular technology, marker analysis to establish the segregation of the factor VIII (FVIII) locus continues to be used in many laboratories. Improved screening strategies for inversions, large rearrangements and point mutations are useful in determining the molecular pathology of patients with haemophilia A (HA) [1]. However, when affected members are not available or when the mutation is undetected, these techniques could suffer from limitations for carrier diagnosis [2]. Moreover, in some circumstances—cases of false paternity or families with more than one mutation [3]—carrier and prenatal diagnoses may be difficult to interpret using only mutation analysis. Thus, gene tracking with polymorphic intragenic DNA markers complements molecular diagnosis in HA.

At present, PCR techniques allow the speedy detection of three (CA/TG)<sub>n</sub> dinucleotide repeat

markers in intron 13, intron 22 and intron 1 [4,5] and the DNA dimorphism for restriction enzyme *BclI* in intron 18 [6]. An *XbaI* Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) marker in intron 22 [7] was mainly studied by Southern blot and a protocol to detect it by long PCR has been described [8]. These markers are helpful in identifying the X chromosome bearing the mutation in a given family. However, a number of women-at-risk remain uninformative in the FVIII gene after testing.

We present a detailed description of two polymorphic dinucleotide repeats in intron 9 and intron 25 (the latter formerly known as intron 24, see Patients, materials and methods) of the FVIII gene, and a working protocol for their detection. These markers improve carrier detection in HA and may be incorporated into routine analysis.

## Patients, materials and methods

In our cohort of HA carriers under study, 34 proved to be uninformative for five intragenic markers routinely used in our laboratory (see below) and were subsequently analyzed for the intron 9 and intron 25 repeats. In addition, 100 unrelated women from our population were tested

Correspondence: Eduardo F. Tizzano, MD, PhD, Department of Genetics, Hospital Sant Pau, Padre Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.

Tel.: +34 93 2919361; fax: +34 93 2919494;

e-mail: etizzano@santpau.es

Accepted after revision 4 March 2008

© 2008 The Authors

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd

489

490 A. VENCESLÁ *et al.*

to define the allele frequencies and to calculate heterozygosity. For multi-allele polymorphisms, the expected heterozygosity rate was calculated in accordance with the Hardy-Weinberg equation as  $1 - (p^2 + q^2 + r^2 \dots)$  where  $p, q, r \dots$  etc. are allele frequencies.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood by a standard method [9]. Markers intron 1 (CA/TG)n repeat, intron 13 (CA/TG)n repeat, *BclI* dimorphism at intron 18, intron 22 (CA/TG)n repeat and *XbaI* RFLP at intron 22 were performed as previously described [4-8].

### Intron 9 (TC/GA)n

The intron 9 in the FVIII gene has 4973 base pairs. The (TC/GA)n repeat was identified after the middle of the intron 9 starting at nucleotide 5011670 from the complete X-chromosome sequence available (GenBank accession number NT\_011726.13). In fact, this sequence is the complementary chain and reading 5' to 3' is represented by AG instead of TC repeats (Fig. 1a). There are 14 TC repeats followed by one G, two more TC repeats, one TG and finally eight more TC repeats. In our experience, the dinucleotides vary in the first part ranging from 14 to 17 (see below). Direct sequencing of the fragments determined the exact number of TC repeats (Fig. 2a). PCR products from patients homozygous for alleles with different size fragments were purified with a QIAquick column PCR purification kit (Qiagen, Izasa, Barcelona, Spain), and analyzed by direct forward- and reverse sequencing, using a DNA sequencing kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Madrid, Spain) on a 3100 Avant Genetic Analyser.

For the intron 9 TC/GA repeat procedure, DNA was amplified using INT9 forward primer 5'GAG-GTGGGATTGATATTTTCA3' and INT9 reverse primer 5'GCACTCCAGCCTGGGTGAC3' using NED<sup>TM</sup> as fluorescent dye to label the forward

primer. The reaction was performed in 25 µL volume with 0.8 mM of dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM of each primer, 250 ng of DNA and 0.0125 U *Taq* Polymerase and it was subjected for 6 min at 94°C and to 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 2 min at 72°C, with a final extension step of 10 min at 72°C. PCR products of approximately 150 bp (depending on the number of TC/GA repeats) (Fig. 2a) were diluted in 5 µL water and 1 µL of this mix with 19 µL of formamide and 0.5 µL ROX-500 Genescan size standard was loaded in a 3100-POP 6<sup>TM</sup> Performance Optimized Polymer (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Madrid, Spain). Samples were analyzed in an ABI Prism 3100 and 3130 (Gene Scan software) (Perkin Elmer-Applied Biosystems) using GENESCAN 3.7 (ABI) (Fig. 2b).

### Intron 25 (GT/AC)n

As per procedures of the GenBank accession number NT\_011726.13, intron 25 in the FVIII gene encompasses nucleotides 4886501-4909181 and has around 22 680 bp. The (GT/AC)n repeat was identified in the middle of the intron 25 starting at nucleotide 4898834 from the complete X-chromosome sequence available (Fig. 1b). Thus, this marker, previously considered to be located in intron 24 [10] is in fact found to be located in intron 25. Moreover, the intron 24 is around 1100 bp and a close inspection of its complete sequence revealed no dinucleotide repeats.

The PCR of intron 25 was performed as per procedures developed by Kim *et al.* [10] using the same primers and fluorescent dye with some modifications, i.e. 25 µL of final volume with 0.8 mM of dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µM of each primer, 250 ng of DNA and 0.2 U *Taq* Polymerase. The amplification setting was the same as for intron 9. PCR products of approximately 136 bp (depending on the number of GT/AC repeats) were diluted in 8 µL water

```
(a)
5011561 tgagctgtgatcaccacagcactccagcctggtgacagaatgagaccctatctcaag
5011621 agagagagagagagagag ca gaga c gagagagagagagagagagagagagatggaagagc
5011681 aataacatggaagctgcagcgaa gaa ccctgaaatacaatccacctccagatctgag

(b)
4898761 aacaatagaaatttttctcacagttctggaggctcaaa gtccaagatcaagggtatg
4898821 gcaggctgtttgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtatttttttt
4898881 gtctgtgtgtttttgagatggagttctccctctgta gtcca ggctggaatgtgatggcgc
```

Fig. 1. (a) Factor VIII (FVIII) available sequence (GenBank accession number NT\_011726.13), which is in fact the complementary chain of FVIII. Numbers on the left correspond to the position in the contig of the X chromosome. The intron 9 region encompasses the variable AG repeat (bold italics) and the complementary primers used for detection (underlined). Grey boxes denote the extra repeats, which in our experience are usually stable (further explanation in the text). (b) Complementary sequence of the intron 25 region encompassing the GT repeats (italics) and the primers used for detection (underlined). This repeat was originally described from this sequence but in a different location (10).

## APPLICATION OF INTRON 9 AND INTRON 25 IN DIAGNOSIS OF HAEMOPHILIA A 491

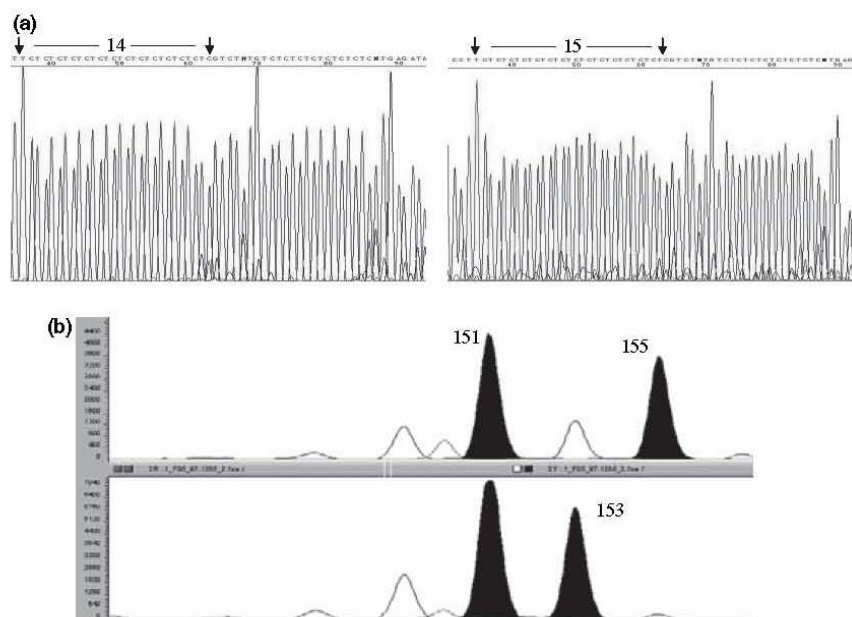


Fig. 2. (a) Sequence and electropherogram of the intron 9 PCR product. Arrows denote the variable repeats (left = 14 TC repeats; right = 15 TC repeats). (b) Electropherogram of intron 9 repeat showing the most frequent alleles observed in our population. The numbers represent the size of the PCR fragments. Samples were analyzed in an ABI Prism 3100 and 3130 (Gene Scan software) (Perkin Elmer-Applied Biosystems) using GENESCAN 3.7 (ABI).

and 1  $\mu\text{L}$  of this mix with 19  $\mu\text{L}$  of formamide and 0.5  $\mu\text{L}$  of ROX-500 Genescan size standard was loaded in a 3100-POP 6<sup>TM</sup> Performance Optimised Polymer. Samples were analyzed as for intron 9.

## Results

### Cumulative heterozygosity rate of common markers

Four markers routinely employed in our laboratory (intron 1 (CA/TG)<sub>n</sub> repeat, intron 13 (CA/TG)<sub>n</sub> repeat, *Bcl*I dimorphism at intron 18 and intron 22 (CA/TG)<sub>n</sub> repeat) enabled us to identify the X chromosomes in 87 of 100 unrelated women. These 87 women had at least one informative marker. Individual and cumulative values of heterozygosity rate are depicted in Fig. 3. Intron 13 marker was the most informative followed by intron 22, intron 1 and intron 18 as to being informative, in that order. The addition of intron 9 and intron 25 markers allowed us to increase the number of heterozygous women from 87 up to 91.

### Allele frequency and heterozygosity of intron 9

Two hundred X chromosomes from 100 women showed that the most abundant allele was (TC)<sub>14</sub>

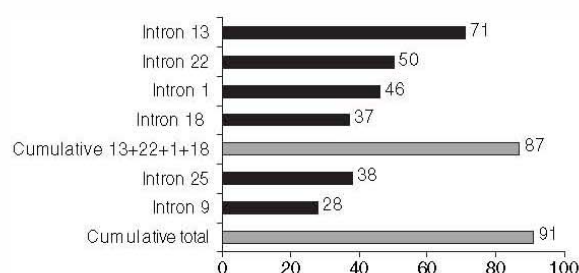


Fig. 3. Individual (black bars) and cumulative (grey bars) heterozygosity rate (HR) of intragenic markers in 100 Spanish unrelated females (further explanation in the text).

followed by (TC)<sub>15</sub> and (TC)<sub>16</sub> alleles. An allele with 17 repeats was found only once. The frequency of these alleles was estimated to be 84% for (TC)<sub>14</sub>, 11.5% for (TC)<sub>15</sub>, 4% for (TC)<sub>16</sub> and 0.5% for (TC)<sub>17</sub>. The expected heterozygosity was 0.28. Given that 28 of 100 women were found to be heterozygous for the marker, the heterozygosity observed was 0.28.

### Allele frequency and heterozygosity of intron 25

Two hundred X chromosomes from 100 women showed that the most abundant allele was (GT)<sub>18</sub>,

492 A. VENCESLÁ *et al.*

followed by (GT)<sub>20</sub>, (GT)<sub>19</sub>, (GT)<sub>16</sub> and (GT)<sub>21</sub> alleles. The frequency of these alleles was estimated to be 75.5% for (GT)<sub>18</sub>, 10.5% for (GT)<sub>20</sub>, 9% for (GT)<sub>19</sub>, 3.2% for (GT)<sub>16</sub> and 1.5% for (GT)<sub>21</sub>. The expected heterozygosity was 0.41. Given that 38 of 100 women were found to be heterozygous for the marker, the observed heterozygosity was 0.38.

#### *X-chromosome identification in previously uninformative carriers*

Of the 34 carriers under study who were uninformative for the five common intragenic markers, four (12%) were heterozygous for the intron 9 marker and seven (20%) were heterozygous for the intron 25 marker allowing the identification of the X chromosome in 11 of 34 (32%) of these females. We observed no allelic association or linkage disequilibrium with the remaining FVIII markers.

#### Discussion

Carrier detection and prenatal testing in HA are accomplished with polymorphic intragenic DNA markers in many laboratories. The use of indirect strategies are necessary to overcome some difficulties in genetic counselling, i.e. when the mutation is not detected in a patient after inversion-screening and after a complete sequencing of the gene, or when the index case is unavailable for testing. Indeed, it is possible to use markers to exclude carrier status when healthy brothers or uncles are available in the family. In recent years, the demand by HA carriers for pre-implantation genetic diagnosis has been growing. Given that lack of marker heterozygosity constitutes a drawback in some families, the availability of additional markers detected by fluorescent methods could help to facilitate the identification of the mutated allele in a single embryonic cell. Moreover, this would minimize the error probability on account of intragenic recombination.

Limited information on intron 9 TC/GA(n) repeat was available owing to its publication in an abstract by Dardik *et al.* [11]. These authors described three alleles ranging from 14 to 16 repeats. In our study, we detected the three alleles, and a fourth very uncommon allele of 17 repeats. The repeats are distributed in three zones: the longest and most variable zone with 14–17 repeats and two shorter ones with two and eight stable repeats. Analysis of 200 chromosomes of our population revealed that the intron 9 repeat is less informative (0.28) than other markers in our population (Fig. 3) [5]. How-

ever, given the absence of a clear allelic association with the remaining markers, this repeat could be used in combination with other available polymorphisms to complete carrier diagnosis studies.

The intron 25 repeat has been reported by Kim *et al.* [10]. These authors described the marker as located in intron 24. Careful analysis of the available sequence of the FVIII gene indicates that the (GT/AC)<sub>n</sub> repeat starts in the middle of the intron 25 at nucleotide 4898834. This intron is one of the largest of the FVIII gene with approximately 22 kb. On the other hand, intron 24 is around 1100 bp and no repeat has been found in its sequence. In our Spanish population, we detected five alleles ranging from 16 to 21 repeats and the 18 repeats account for more than 75% of cases. Kim *et al.* reported 10 different alleles in the Korean population and the most frequent allele (79%) had also 18 repeats. The heterozygosity reported by these authors (0.35) resembled that of our population (0.38). These data lend support to the use of intron 25 marker in routine studies.

The application of the intron 9 CT/AG(n) and intron 25 GT/AC(n) repeat allowed us to identify the X chromosome in 11 of 34 (32%) previously uninformative carriers. Furthermore, the cumulative heterozygosity rate of the four common intragenic markers, used in HA in our laboratory, was increased from 0.87 to 0.91 by the addition of intron 9 and intron 25 repeats. We applied these markers in routine analyses in families at our centre, and observed a complete segregation with the FVIII gene mutation, allowing successful carrier and prenatal diagnoses. Therefore, because of their reliability and their accessible protocol of detection, these markers may complement and assist X-chromosome identification in HA families.

#### Acknowledgement

The work was supported by Fundació Catalana d'Hemofilia.

#### Disclosures

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

#### References

- 1 Keeney S, Mitchell M, Goodeve A. The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization haemophilia

## APPLICATION OF INTRON 9 AND INTRON 25 IN DIAGNOSIS OF HAEMOPHILIA A 493

- genetics laboratory network. *Haemophilia* 2005; 11: 387-97.
- 2 Klopp N, Oldenburg J, Uen C, Schneppenheim R, Graw J. 11 haemophilia A patients without mutations in the factor VIII encoding gene. *Thromb Haemost* 2002; 88: 357-60.
  - 3 Tizzano EF, Venceslá A, Baena M *et al.* First report of two independent point factor VIII mutations in a family with haemophilia A: a word of caution for carrier diagnosis. *Thromb Haemost* 2005; 94: 675-7.
  - 4 Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelides K, Tuddenham EG. Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene. *Br J Haematol* 1994; 86: 804-9.
  - 5 Tizzano E, Venceslá A, Cornet M, Baena M, Baiget M. Utility of a (GT)<sub>n</sub> dinucleotide repeat in intron 1 of the factor 8 gene for haemophilia A carrier diagnosis. *Haemophilia* 2005; 11: 142-4.
  - 6 Peake I. R., Lillicrap D.P., Boulyjenkov V. *et al.* Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 313-44.
  - 7 Chan V, Tong TM, Chan TP *et al.* Multiple *Xba*I polymorphisms for carrier detection and prenatal diagnosis of haemophilia A. *Br J Haematol* 1989; 74: 497-500.
  - 8 El-Maarri O, Oldenburg J, Cañalyan SH. Intron 22-specific long PCR for the *Xba*I polymorphism in the factor VIII gene. *Br J Haematol* 1999; 105: 1120-2.
  - 9 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 6: 1215.
  - 10 Kim JW, Park SY, Kim YM, Kim DJ, Ryu HM. Identification of new dinucleotide-repeat polymorphisms in factor VIII gene using fluorescent PCR. *Haemophilia* 2005; 11: 38-42.
  - 11 Dardik R, Kenet G, Kornbrot N, Rosenberg N, Martinowitz U. Two novel polymorphic microsatellite markers in the FVIII gene useful in haemophilia A diagnosis. *Haemophilia* 2002; 8: 567-8.





## **2. IDENTIFICAR Y CARACTERIZAR LA PATOLOGÍA MOLECULAR DE PACIENTES ESPAÑOLES CON HEMOFILIA A.**

Este apartado hace referencia a los resultados que derivan del estudio del gen *factor 8* en pacientes afectados con hemofilia A en la población española. De ahí que el trabajo de investigación que se presenta, ha estado dirigido a la búsqueda de la patología molecular causante de la enfermedad en dichos pacientes, con el uso de todas las técnicas necesarias.



FIRST REPORT OF TWO INDEPENDENT POINT FACTOR VIII MUTATIONS IN A FAMILY WITH HAEMOPHILIA A: A WORD OF CAUTION FOR CARRIER DIAGNOSIS.

*THROMB. HAEMOST.*

2005; 94:675-7

Tizzano EF, Venceslá A, Baena M, Cornet M, Calvo MT, Lucía JF, Pérez Garrido R, Núñez R, Baiget M

Síntesis del estudio:

En este trabajo se presenta una familia con dos mutaciones en el gen *F8*. Gracias al estudio en profundidad tanto del haplotipo que permitió definir que cada mutación ocurría en un cromosoma distinto, como del análisis molecular del gen *F8*, se pudo resolver la presencia de dos mutaciones en esta familia. Una de ellas se trataba de una mutación *missense* en el exón 18 heredada y presente en los hemofílicos moderados de esta familia. La otra era una mutación *frameshift* que había surgido de *ново* en el hemofílico grave.





## Case Report

### First report of two independent point factor VIII mutations in a family with haemophilia A: a word of caution for carrier diagnosis

Large rearrangements are common within the factor VIII gene (*FVIII*) in severe haemophiliacs. They include: the inversion of intron 22, which accounts for approximately 45% of severe patients (1), the inversion of the intron 1, also a recurrent event although ten times less frequent than intron 22 inversion (2, 3), and large deletions, accounting for approximately 5% of severe patients. The remaining mutations are heterogeneous and are widespread within the *FVIII* gene, resulting in severe, moderate or mild HA cases. Although the same mutation has occasionally been observed in unrelated patients, each affected family generally has its own mutation (HAMSTERS, <http://europium.csc.mrc.ac.uk>). Moreover, the finding of more than one *FVIII* mutation within haemophiliacs of the same family has not been reported to date. Traditionally, in a haemophilia A (HA) family with more than one affected member, genetic information from a single haemophiliac is sufficient for carrier diagnosis either by identifying the X-chromosome using marker analysis of the *FVIII* locus or by mutation detection. We present a family in which second degree-affected cousins showed two independent point *FVIII* mutations in different chromosomal backgrounds and phenotypes. In the severe HA patient, the molecular defect was a de novo p.K1439fsX3 mutation in exon 14, whereas his two mildly affected cousins showed a transmitted p.R1966Q in exon 18. The finding of two mutations in the same family demands a cautious approach to gene carrier diagnosis in familial HA with data from only one of the affected patients. Detailed information on the pedigree and on the type of haemophilia may yield further insight into atypical families such as the one presented here.

#### Methods

After obtaining informed consent, DNA was isolated from peripheral blood samples using the salting-out method. The inversion of intron 22 and intron 1 was excluded as previously described (3). The haplotype was obtained from several markers previously described (4 and references therein). To characterise the mutation in the *FVIII* gene, the coding regions and exon-in-

tron boundaries were amplified according to David et al. (5) with minor modifications in the reaction conditions. The amplified fragments were then purified with a QIAquick column PCR purification kit (Qiagen, Izasa, Barcelona, Spain), and analysed by direct forward and reverse sequencing using a DNA sequencing kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Madrid, Spain) on an ABI PRISM 3100 Avant DNA automatic sequencer.

#### Family report

We received a blood sample from a child affected with severe HA, her mother and their grandparents for molecular analysis. The pedigree of the family (Fig. 1) indicated that the individual under study (IV-1) was linked to the other haemophiliacs through his apparently non-affected maternal grandfather II-2. Moreover, initial marker analysis of members IV-1, III-3, II-2 and II-3, indicated that the X chromosome with the mutation was transmitted by individual II-2. It was suspected that the grandfather II-2 had probably been misdiagnosed as non-haemophilic. However, repeated plasma determinations of FVIII:C activity showed levels within the normal range.

A frameshift mutation within exon 14 was detected in patient IV-1. This was an adenine (A) insertion within a sequence of eight As at nucleotides 4372 to 4379 (codons 1439–1441) resulting in a stop codon at 1442 (p.K1439fsX3, nomenclature according to [6]). The mutation was present in the patient's mother but it was not detected in the DNA from peripheral blood lymphocytes of the grandparents II-2 and II-3. Given that the patient II-4 was living abroad and was therefore not available for study, we proceeded to analyse his obligate carrier sister II-1 and her two mildly affected sons III-1 and III-2. The point mutation in exon 14 was absent in these patients and the marker analysis showed that the HA locus in these haemophiliacs differed from the HA locus of patient IV-1. Further analysis of the remaining coding regions of the *FVIII* gene demonstrated a G>A transition in nucleotide 5954 in exon 18, resulting in a p.R1966Q mutation affecting the FVIII A3 domain. Analysis of both mutations in the remaining members of the family demonstrated that the p.K1439fsX3 was not present in patients III-1, III-2 nor in their mother II-1. Concomitantly, in individuals II-2, III-3 and IV-1 the p.R1966Q was excluded. Further marker analysis confirmed that both mutations occurred in different X-chromosomes (Fig. 1).

#### Discussion

Affected members of families with autosomal dominant and X-linked disorders usually share the same causative gene mutation. However, unusual cases of more than one mutational event in the same family have been reported in the NF1 gene (7, 8). Moreover, the segregation of two different mutations in the RB1 gene and in the APC gene has been published (9, 10). Al-

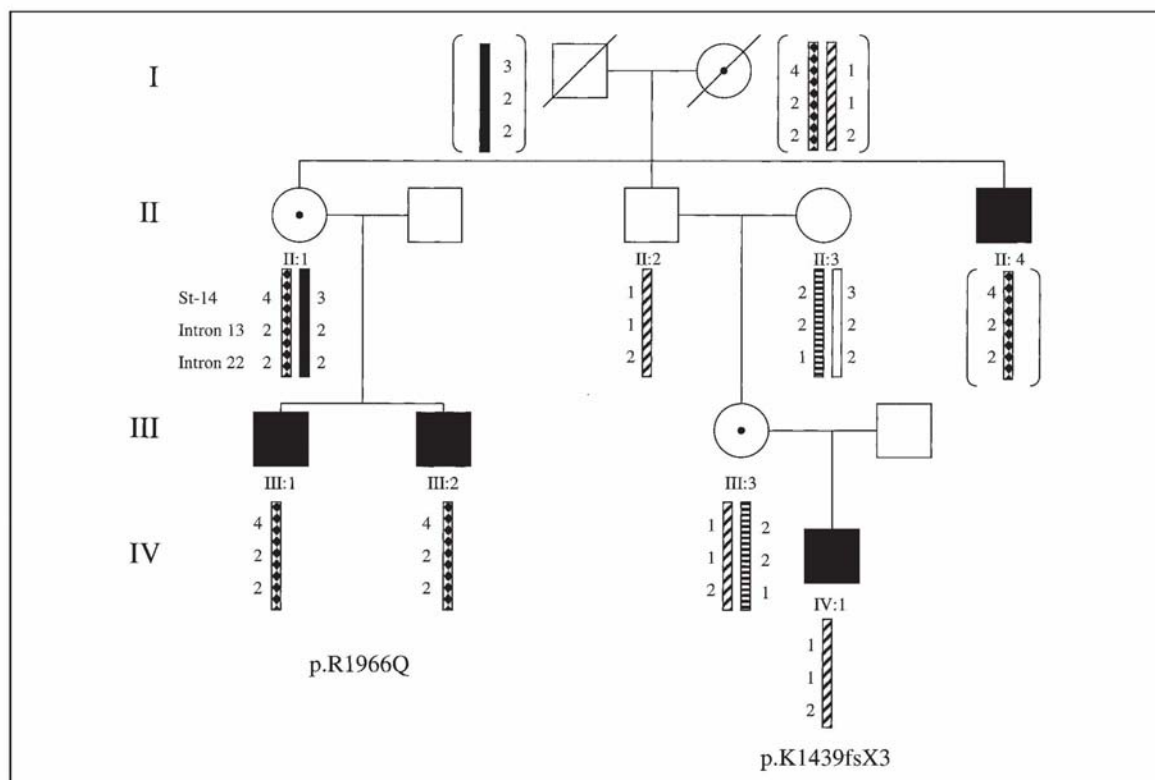
Correspondence to:  
Eduardo F. Tizzano, M.D., Ph.D.  
Department of Genetics, Hospital of Sant Pau  
Av. Padre Claret 167  
08025, Barcelona, Spain  
Tel.: +34-93-2919361, Fax: +34-93-2919494  
E-mail: [etizzano@hsp.santpau.es](mailto:etizzano@hsp.santpau.es)

Received March 30, 2005  
Accepted after revision May 15, 2005

Financial support:  
This work was supported by Fundació Privada Catalana de l'Hemofilia.

**Thromb Haemost 2005; 94: 675–7**

## Case Report



**Figure 1: Pedigree of the family reported.** The de novo mutation was an insertion of an adenine in a sequence of 8 As at nucleotide 4372 (codon 1439–1441) that predicts a frameshift at codon 1442 (p.K1439fsX3) and was detected only in patient IV-1 and his mother III-3. The mutation originated in the germ cells of the grandfather II-2. The transmitted mutation in this family was a G>A transition in nucleotide 5954 in exon 18, predicting the replacement of an arginine by a glutamine, (p.R1966Q) and was detected in members II-1, III-1 and III-2. Informative markers illustrated are: St14VNTR (1,2,3,4), Intron 13 microsatellite (1,2) and Intron 22 microsatellite (1,2). Haplotypes in brackets are inferred.

though a female affected by severe HA with two de novo *FVIII* mutations (a *FVIII* inversion and a gross X chromosomal deletion) has been described (11), our report is the first to show the coincidence of two different *FVIII* mutations within haemophiliacs of the same family. The p.R1966Q mutation was transmitted in at least two generations and the p.K1439fsX3 mutation originated de novo in the maternal grandfather's germ cells of the patient IV-1.

Many haemophiliacs are regarded as sporadic cases whereas others belong to pedigrees with a family history of the disease. To maintain Haldane's genetic equilibrium between mutation and selection, some sporadic cases are due to new mutations (12). The probability that one member in a given HA family might be affected with HA on account of a new *FVIII* mutation is the mutation rate of HA, approximately  $4 \times 10^{-5}$  per gene per gamete per generation (13). This figure, one of the highest established in human disorders, is in the range of the mutation rate of the NF1 gene ( $3.1-10.4 \times 10^{-5}$ ) and the DMD gene ( $4.7-10.5 \times 10^{-5}$ ) (13). Thus, the occurrence of a new mutation in a member of a given HA family should be considered as a very rare event. Notwithstanding, the de novo mutation that occurred in our

family originated in the maternal grandfather's germ cells, which usually have a higher mutation rate than that of the oocytes in HA (14). Moreover, this mutation occurred in exon 14, the largest and most common mutated exon of the *FVIII* gene, and in a poly A site prone to insertions or deletions.

It would not be prudent to assume an identical mutation in one affected member of a family when a single mutation is detected in another affected individual, especially when they are not first-degree relatives. In our family, careful retrospective consideration of some characteristics could have suggested an atypical situation. The first point is the pedigree analysis. Patient IV-1 of this family was linked to the other haemophiliacs through his apparently non-affected maternal grandfather (II-2). Further information excluded haemophilia in this grandfather. The second point concerns the phenotype of the patients. Within a family, patients tend to present a similar *FVIII* activity despite occasional differences in bleeding episodes. Based on *FVIII*:C activity, patient IV-1 had severe haemophilia (less than 1%) and his cousins were regarded as mild HA patients (more than 5%). Any ambiguity concerning paternity of the offspring III-3 was ruled out when it was observed that she had inherited the X-chro-

## Case Report

mosome from her father II-2. Furthermore, marker analysis was useful to determine that the X-chromosome bearing the mutation in cousins III-1 and III-2 and their mother II-1 was different from the X-chromosome inherited by individual II-2. We assumed that the mutation in haemophiliac II-4 was transmitted by his mother I-2 and is the same as in individuals III-1 and III-2 (Fig. 1).

Despite the rapid advances in molecular technology, our report stresses the importance of having at our disposal 1) accurate pedigree data on each family 2) information on the phenotype of each patient and 3) the possibility to perform marker analysis to determine the segregation of the *FVIII* locus. Given the high mutation rate of HA, molecular carrier diagnosis in familial HA with only information on the mutation of one patient should be

carried out with caution, especially when the haemophiliacs are not first-degree relatives.

## Acknowledgements

We are indebted to L. Alias and S. Bernal for help in the preparation of the manuscript and to V. Volpini for helpful comments.

*Eduardo F. Tizzano<sup>1</sup>, Adoración Venceslá<sup>1</sup>, Manel Baena<sup>1</sup>, Mónica Cornet<sup>1</sup>, María T. Calvo<sup>2</sup>, José F. Lucía<sup>3</sup>, Rosario Pérez Garrido<sup>4</sup>, Ramiro Núñez<sup>4</sup>, Montserrat Baiget<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Department of Genetics, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Genetics, <sup>3</sup>Department of Hematology, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain

<sup>4</sup>Hemophilia Unit. Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

## References

1. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M. et al. Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an International Consortium study. *Blood* 1995; 86: 2206–12.
2. Bagnall RD, Waseem N, Green P et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood* 2002; 99: 168–74.
3. Tizzano EF, Cornet M, Baiget M. Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of haemophilia A. *Haematologica* 2003; 88: 118–120.
4. Tizzano EF, Vencesla A, Cornet M, et al. Utility of a (GT)<sub>n</sub> polymorphism in the intron 1 of the factor VIII gene for haemophilia A carrier diagnosis. *Haemophilia* 2005; 11: 142–4.
5. David D, Moreira I, Laloz MRA et al. Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 257–64.
6. [http:// www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/recs-prot.html](http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/recs-prot.html)
7. Klose A, Peters H, Hoffmeyer S et al. Two independent mutations in a family with neurofibromatosis type 1 (NF1). *Am J Med Genet* 1999; 83: 6–12
8. Upadhyaya M, Majounie E, Thompson P et al. Three different pathological lesions in the NF1 gene originating de novo in a family with neurofibromatosis type 1. *Hum Genet* 2003; 112: 12–17
9. Munier FL, Wang MX, Spence MA et al. Pseudo low penetrance in retinoblastoma. Fortuitous familial aggregation of sporadic cases caused by independently derived mutations in two large pedigrees. *Arch Ophthalmol* 1993; 111 : 1507–11.
10. Davidson S, Leshanski L, Rennert G et al. Maternal mosaicism for a second mutational event a novel deletion in a familial adenomatous polyposis family harbouring a new germ-line mutation in the alternatively spliced exon 9 region of APC. *Hum Mutat* 2002; 19: 83–4.
11. Windsor S, Lying A, Taylor S et al. Severe haemophilia A in a female resulting from two de novo factor VIII mutations. *Br J Haematol* 1995; 90: 906–9.
12. Haldane JBS. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J Med Genet* 1935; 31: 317–26.
13. Vogel F, Motulsky A. *Human Genetics: Problems and Approaches* 1986. Berlin, Germany, Springer Verlag, pp 347–350.
14. Becker J, Schwaab R, Moller-Taube A et al. Characterization of the Factor VIII defect in 147 patients with sporadic haemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 657–70.





IDENTIFICATION OF 31 NOVEL MUTATIONS IN THE FACTOR 8 GENE IN SPANISH  
HEMOPHILIA A PATIENTS: STRUCTURAL ANÁLISIS OF 20 *MISSENSE* MUTATIONS  
SUGGESTS NEW INTERMOLECULAR BINDING SITES

*BLOOD.*

2008 Apr 1; 111(7):3468-78.

Venceslá A, Corral-Rodríguez MA, Baena M, Cornet M, Domènech M, Baiget M, Fuentes-  
Prior P, Tizzano E

Síntesis del estudio:

El análisis molecular de 267 pacientes con HA dieron como resultado 31 mutaciones que no habían sido identificadas anteriormente ni en la literatura ni en la base de datos de la HA. De estas 31 mutaciones, 20 fueron cambios *missense* que se sometieron a un estudio complementario para confirmar que eran las causantes de la enfermedad en el paciente. Basándonos en el análisis estructural, la interpretación de las mutaciones *missense* podrían agruparse en dos, las de tipo I que se corresponden con una deficiencia cuantitativa del factor VIII y las de tipo II que dan lugar a una deficiencia cualitativa de dicho factor.



2º Premio Martín Villar (2009), de los Premios de investigación sobre Hemostasia, (Grifols).



From [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org) at CSIC - Unidad Coordinacion Bibliotecas on March 27, 2008. For personal use only.

# blood

2008 111: 3468-3478  
Prepublished online Jan 9, 2008;  
doi:10.1182/blood-2007-08-108068

## Identification of 31 novel mutations in the F8 gene in Spanish hemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites

Adoración Venceslá, María Ángeles Corral-Rodríguez, Manel Baena, Mónica Cornet, Montserrat Domènech, Montserrat Baiget, Pablo Fuentes-Prior and Eduardo F. Tizzano

---

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/111/7/3468>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:

[Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology](#) (2358 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

[http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub\\_requests](http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published semimonthly by the American Society of Hematology, 1900 M St, NW, Suite 200, Washington DC 20036.

Copyright 2007 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



## Identification of 31 novel mutations in the *F8* gene in Spanish hemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites

Adoración Venceslá,<sup>1</sup> María Ángeles Corral-Rodríguez,<sup>2</sup> Manel Baena,<sup>1</sup> Mónica Cornet,<sup>1</sup> Montserrat Domènech,<sup>1</sup> Montserrat Baiget,<sup>1</sup> Pablo Fuentes-Prior,<sup>2</sup> and Eduardo F. Tizzano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras Instituto de Salud Carlos III and <sup>2</sup>Cardiovascular Research Center, Spanish National Research Council-Catalan Institute of Cardiovascular Sciences, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Hemophilia A (HA) is an X-linked bleeding disorder caused by a wide variety of mutations in the factor 8 (*F8*) gene, leading to absent or deficient factor VIII (FVIII). We analyzed the *F8* gene of 267 unrelated Spanish patients with HA. After excluding patients with the common intron-1 and intron-22 inversions and large deletions, we detected 137 individuals with small mutations, 31 of which had not been reported previously. Eleven of these were nonsense, frameshift, and splicing mutations, whereas 20 were missense

changes. We assessed the impact of the 20 substitutions based on currently available information about FV and FVIII structure and function relationship, including previously reported results of replacements at these and topologically equivalent positions. Although most changes are likely to cause gross structural perturbations and concomitant cofactor instability, p.Ala375Ser is predicted to affect cofactor activation. Finally, 3 further mutations (p.Pro64Arg, p.Gly494Val, and p.Asp2267Gly) appear to affect cofactor

interactions with its carrier protein, von Willebrand factor, with the scavenger receptor low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP), and/or with the substrate of the FVIII $\alpha$ 1-FIXa (Xase) complex, factor X. Characterization of these novel mutations is important for adequate genetic counseling in HA families, but also contributes to a better understanding of FVIII structure-function relationship. (Blood. 2008;111:3468-3478)

© 2008 by The American Society of Hematology

### Introduction

Deleterious changes in the human *F8* gene reduce activity and/or circulating plasma levels of factor VIII (FVIII) protein causing hemophilia A (HA). Patients with HA are classified according to their plasma procoagulant levels of FVIII: severe (< 0.01 IU/mL), moderate (0.01-0.05 IU/mL), or mild (0.05-0.4 IU/mL).<sup>1</sup> The *F8* gene is located at Xq28 and spans 186 kb genomic DNA, with 26 exons. Mature FVIII is composed of 2332 residues with an A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 domain organization. The 3 A domains are homologous to the plasma ferroxidase, ceruloplasmin, while the 2 C-terminal domains belong to the widespread family of discoidin-like modules. The A and C domains of FVIII are also similar to those of coagulation factor V, and adopt similar quaternary structures in both activated cofactors.<sup>2,3</sup> By contrast, the heavily glycosylated B domain is related neither to the corresponding FV region nor to any other reported protein. Domains A1/A2, A2/B, and B/A3 are connected by relatively long linkers rich in acidic residues, which are termed a1 to a3. None of these peptides has homologs in ceruloplasmin, while a2 and a3, but not a1, have functional counterparts in FV.

FVIII circulates in plasma bound to the carrier protein, von Willebrand factor (VWF), as multiple heterodimeric forms containing various lengths of the B-subunit covalently attached to the A1-a1-A2-a2 region (the heavy chain) and an a3-A3-C1-C2 light chain. Cofactor activation requires thrombin-mediated cleavage of peptide bonds Arg372-Ser373 (in the a1-A2 linker), Arg740-

Ser741 (a2-B), and Arg1689-Ser1690 (a3-A3); exosite-mediated thrombin interactions with the acidic a1-a3 peptides appear to be essential for these proteolytic cleavages. The resulting A1-a1/A2-a2/A3-C1-C2 heterotrimer no longer interacts with VWF but binds to the serine protease, FIXa, on negatively charged phospholipid membranes provided by activated platelets. This calcium-dependent complex of FVIIIa, FIXa, and acidic phospholipids, also termed intrinsic Xase, activates FX via cleavage of a single peptide bond (Figure 1A; recently reviewed by Fay and Jenkins<sup>4</sup> and Graw et al<sup>5</sup>). In addition to its role in cofactor activation, the acidic region a1 is involved in important interactions with the Xase substrate, FX.<sup>6,7</sup>

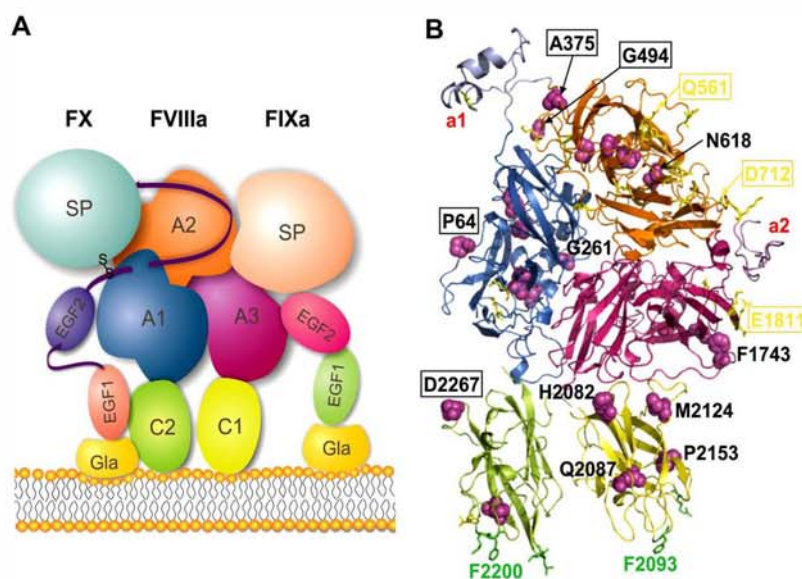
The crystal structure of the FVIII C2 domain<sup>8</sup> and those of human ceruloplasmin<sup>9</sup> and bovine inactivated FVa (FVai; Adams et al<sup>2</sup>) have provided valuable templates for developing FVIIIa models of increased accuracy (see, eg, Pemberton et al,<sup>10</sup> Liu et al,<sup>11</sup> Stoilova-McPhie et al,<sup>12</sup> and Autin et al<sup>13</sup>). The recently reported crystal structure of human FVIIIa at low resolution<sup>3</sup> confirmed that the side-by-side arrangement of C1 and C2 domains previously observed in bovine FVai<sup>2</sup> and incorporated in a recent modeling study<sup>13</sup> is the most likely conformation for both cofactors, at least in their uncomplexed states. On the other hand, identification of novel mutations leading to HA and their thorough analysis has helped to define areas involved in important interdomain contacts, membrane binding, as well as in interactions with cognate

Submitted August 21, 2007; accepted December 18, 2007. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, January 9, 2008; DOI 10.1182/blood-2007-08-108068.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2008 by The American Society of Hematology



**Figure 1. Structure and function of Xase complex.** (A) Schematic representation of Xase complex and mechanism of factor X activation. The major structural domains of cofactor VIIIa, its cognate protease FIXa, and substrate FX are labeled, and represented in the approximate positions they would occupy in the Xase complex. The long FX activation peptide is also indicated as a ribbon, pointing to the insertion of the Arg194(15)-Ile195(16) activation peptide bond in the active site of FIXa. (Numbers in parentheses refer to the standard chymotrypsinogen numbering system.) Gla indicates  $\gamma$ -carboxyglutamic-rich domain; EGF1/EGF2, epidermal growth factor-like domains 1 and 2; and SP, serine protease domain. (B) Three-dimensional model of human FVIIIa, highlighting the side chains of all novel missense mutations identified in the current investigation (light magenta spheres). The 5 FVIIIa domains are represented with their major secondary structure elements and color-coded as in panel A. For clarity, only selected residues are labeled, including the 4 exposed residues Arg64, Ala375, Gly494, and Asp2267 (boxed). The acidic a1 and a2 peptides are included only to indicate their locations on opposite poles of domain A2, as no appropriate templates are available for them. Selected side chains of hydrophobic residues in C1/C2 domains that would associate with the phospholipid membrane are in green. Some previously detected mutations of exposed residues are shown as yellow sticks; for clarity, only a few of these residues are labeled (see "Discussion" for details and references). Considering these previous analyses of FVIII mutants, residues important for cognate FIXa binding cluster to the right in the chosen orientation (eg, stretches Ser558-Gln565, Asp712/Lys713, and Glu1811-Lys1819), while those involved in FX recognition map to the left in this orientation (see, eg, the location of the acidic a1 peptide). This clear segregation of residues critical for FIXa/FX binding allows us to predict important roles for residues Pro64, Gly494, and Asp2267 in substrate binding and presentation to the FVIIIa-FIXa (Xase) complex.

FIXa and substrate, FX.<sup>4,5</sup> Therefore, characterization of *F8* mutations is important for a better understanding of the structure-function relationship of the FVIII molecule. As of January 2007, more than 580 missense mutations have been deposited with the HAMSTeRS database,<sup>14</sup> and recent investigations have added a large number of mutations in different populations (see, eg, David et al,<sup>15</sup> Guillet et al,<sup>16</sup> Repesse et al,<sup>17</sup> and Rossetti et al<sup>18</sup>).

Here, we characterized 31 novel small mutations in the *F8* gene, including 11 nonsense, frameshift, and splicing mutations as well as 20 missense mutations. We also provide a thorough evaluation of the probable structural and/or functional defects caused by these residue replacements.

## Methods

### Patients

We analyzed the *F8* gene in 267 unrelated patients with clinical and laboratory confirmation of HA after obtaining their informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. Approval was obtained from the Ethical Committee from the Hospital of Sant Pau institutional review board for these studies. One hundred ninety-three patients were classified as severe HA and the remaining 72 were moderate to mild cases. Moreover, the patients were defined as familial (positive) or isolated (sporadic) according to their available pedigree information.

### DNA isolation and sequencing

DNA was isolated from peripheral blood samples using the salting-out method. After excluding hemophiliacs with intron 1 and intron 22

inversions and with large deletions, all 26 exons and exon-intron boundaries of the *F8* gene from the remaining patients were amplified using primers and polymerase chain reaction (PCR) conditions essentially as in David et al<sup>19</sup> and as deposited in the HAMSTeRS database.<sup>14</sup> Promoter analysis was performed as previously described.<sup>20</sup> The amplified fragments were purified with QIAquick columns (Qiagen, Isaza, Barcelona, Spain), and analyzed by direct forward and reverse sequencing using a DNA sequencing kit (PerkinElmer-Applied Biosystems, Madrid, Spain) on an ABI PRISM 3100 Avant DNA automatic sequencer (Applied Biosystems, Madrid, Spain).

### Nomenclature

Nucleotide numbering was based on the cDNA sequence (GenBank no. NM\_000132.2<sup>21</sup>), with nucleotide +1 corresponding to the adenine of the ATG translation initiation codon. The amino acid numbering system was based on the mature protein, while residues from the 19-residues-long signal peptide were numbered in reverse. Thus, the initial methionine was numbered as -19 and the first alanine of the mature protein was numbered as +1. The nomenclature used to describe mutations is that of den Dunnen and Antonarakis.<sup>22</sup>

For residues surrounding activation cleavage sites, we used the standard Schechter and Berger nomenclature<sup>23</sup>: substrate residues are denoted  $P_m, \dots, P_1, P_1', \dots, P_n'$ , with the scissile peptide bond located between  $P_1$  and  $P_1'$ .

### Analysis of missense mutations

We ascertained that a given missense mutation is causally related to the patient's HA phenotype in accordance with the following criteria: (1) the mutation cosegregated in other affected individuals or carriers from the same family; (2) it was not detected in a panel of 100 X-chromosomes from the general Spanish population; (3) no other nucleotide change was found in the *F8* coding region or in exon-intron boundaries; (4) the mutated residue

was conserved or conservatively replaced in FVIII from different species, and in most cases in FV and/or ceruloplasmin; and (5) finally, most mutated residues are buried in the protein core, and their replacement would either disrupt networks of buried hydrogen bonds, create destabilizing internal cavities, and/or lead to clashes with neighboring residues. The predicted impact of missense mutations in FVIIIa as well as in equivalent positions of FVai and ceruloplasmin was assessed with PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>, Harvard University) and CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de/>, Cologne University).<sup>24</sup>

### Homology modeling

We separately submitted alignments of the A1-a1-A2-a2-A3 and C1 domains of FV, FVIII, and ceruloplasmin from different species to the Swiss-Model server.<sup>25,26</sup> For the A1-a1-A2-a2-A3 substructure, we used as a template the crystal structure of ceruloplasmin (PDB code 1KCW),<sup>9,27</sup> while the FVIII C1 domain was modeled based on the homologous C2 domain (Pratt et al<sup>8</sup>; PDB code 1D7P). (Proteolytic inactivation of FVa leads to the loss of domain A2 and a concomitant destabilization of nearby domain A1, and therefore the structure of ceruloplasmin represents a better template for modeling the A1-A2-A3 trimer.) The cysteine residue covalently linked to Cys2296 was removed from the 1D7P entry, and the partial models for FVIII A1/A2/A3, C1, and C2 domains were superimposed on the structure of inactivated bovine FVa (PDB 1SDD). Coordinates for bound calcium and copper ions were taken from the latter structure. After manual readjustment of side chains at the interdomain interfaces, especially those involved in cation-binding sites, the resulting trimer was finally minimized with CNS (<http://cns.csb.yale.edu/v1.1/>, Yale University). FX models were constructed using the partial crystal structures for EGF1-EGF2 catalytic domain (1XKA)<sup>28</sup> and Gla domain (1IOD),<sup>29</sup> as well as the solution structure of the Gla-EGF1 tandem (1WHF)<sup>30</sup>; the structure of bovine chymotrypsinogen A was selected to generate FX zymogen conformation (2CGA).<sup>31</sup> FIXa was modeled essentially following the structure of the porcine cofactor<sup>32</sup>; the Gla domain was derived from 1J34<sup>33</sup> and INL0.<sup>34</sup> Similar strategies have been followed by other authors to generate FIXa/FX models.<sup>13,29,35</sup> Model quality was assessed with MOLEMAN2 ([http://xray.bmc.uu.se/cgi-bin/gerard/rama\\_server.pl](http://xray.bmc.uu.se/cgi-bin/gerard/rama_server.pl), Uppsala Software Factory, Uppsala, Sweden); for FVIIIa, that is, 89% of all residues were found in core regions of the Ramachandran plot. Docking was performed with ZDOCK (<http://zdock.bu.edu/>, Boston University) and structure figures were generated with PyMOL (<http://www.pymol.org>, DeLano Scientific, Palo Alto, CA).

After submission of this work, a 3.7-Å crystal structure of human FVIIIa was presented.<sup>3</sup> Although the coordinates for the latter are not yet available, the reported similarity to the previous FVai structure validates all relevant features of the current “compact” model. In particular, the side-by-side arrangement of the C1 and C2 domains is supported by a large hydrophobic/aromatic interface between domains A3 and C1, while C2 lacks important interactions with the remaining domains (Figure 1B). These features are in line with an overall conservation of residues that form the A3-C1 interface in the 2 cofactors.<sup>2,3</sup> Moreover, experimental evidence suggests absence of important contacts between the A2 domain and the cofactor light chain, while interactions with A1 account for 90% of the interchain binding energy.<sup>36</sup> Altogether, current evidence would seem to disfavor a FVIIIa model where domain C1 is located on top of C2 (and thus removed from the phospholipid membrane),<sup>12</sup> and which has been commonly used to rationalize the effect of point mutations on FVIIIa structure.

By contrast, the compact arrangement of globular domains is likely to reproduce the conformation of membrane-bound cofactors Va and VIIIa. We note that topologically equivalent, exposed hydrophobic residues from both discoidin-like domains of FVa<sup>37-39</sup> and FVIIIa<sup>11,40,41</sup> appear to be involved in membrane binding (for a review on structures and interactions mediated by these discoidin-like domains, see Fuentes-Prior et al<sup>42</sup>). In particular, the exposed Tyr1956/Leu1957 pair in the first spike of the human FV C1 domain corresponds to human FVIII residues Lys2092 and Phe2093 (Figure 2B boxed), while arginine residues at positions 2023 and 2027 are conserved as Arg2159 and Arg2163 in

human FVIII. As demonstrated for the FVa residues,<sup>38</sup> the side chains of these topologically equivalent, solvent-exposed FVIIIa residues (eg, Lys2092, Arg2159, Arg2163) could interact with negatively charged phosphatidylserine headgroups,<sup>11</sup> while Phe2093 could be inserted into the apolar membrane core, stabilizing the side-by-side arrangement on procoagulant phospholipid membranes (see Figure 1B, where side chains of some of these residues are shown in green).

Finally, we would like to stress that models for FVIIIa and FVIIIapi-FIXa complexes based on the bovine FVai structure have been developed by Autin et al following a similar strategy.<sup>13</sup> These models, however, have not been used to date to predict the impact of missense mutations in the *F8* gene.

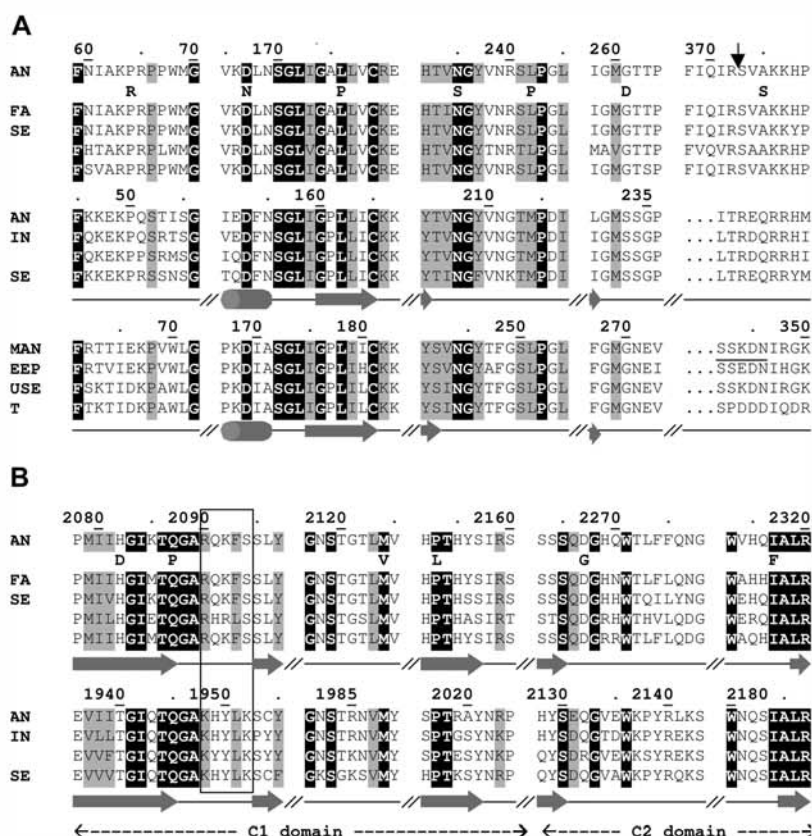
## Results

We identified 137 small mutations in the 267 Spanish HA patients studied in the current work (the remaining 130 patients had intron 1 and 22 inversions and large deletions). Ninety-one of these mutations were missense, 10 were of the nonsense type, 29 were small deletions or insertions, and 7 were splice site mutations (data not shown; available upon request). In particular, we detected 31 novel changes (none deposited to date in the HAMSTeRS database nor reported in recently published articles), including 2 nonsense, 7 frameshift, and 2 splicing mutations (Table 1). Three of these hemophiliacs have developed inhibitors to FVIII.

The remaining 20 mutations were of the missense type for which the criteria described in “Analysis of missense mutations” apply; a detailed description of these mutations is shown in Table 2. According to available information, none of the patients from this group developed inhibitors. All globular domains of the activated cofactor were affected by these novel missense mutations (see Figure 1B, where mutated residues are shown with all their side chain atoms in the FVIIIa model). In line with the greater functional relevance of domains A1 and A2 for FIXa/FX binding, 60% (12/20) of the novel mutations affect residues within one of these domains (6 changes in each domain). Two further mutations were identified in domain A3, 4 in C1, and 2 in the second discoidin-like domain. To illustrate the location of affected positions, partial multiple alignments of FV, FVIII, and ceruloplasmin sequences from different species around all mutated residues in domain A1 are presented in Figure 2A. Similarly, partial alignments around mutations found in C1 and C2 domains from both coagulation factors are given in Figure 2B. These changes are representative of the 20 novel missense mutations identified in the current work, and range from strictly conserved, buried residues that belong to major secondary-structure elements (eg, p.Asp167Asn) to solvent-exposed loop residues that are unique to FVIII (eg, p.Ala375Ser).

Further, and based on structural analysis (Figures 3,4; Tables S1,S2, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) and on consideration of previously reported mutants (Table 3), we interpreted missense mutations as those likely to result in type I or quantitative FVIII deficiency and as those likely to affect cofactor function—type II or qualitative cofactor deficiency. The majority of identified mutations within the first group replace well-conserved, fully or partially buried residues, which is similar to data recently reported by other authors.<sup>14-17</sup> Because these residues engage in multiple, mostly intradomain contacts, the ultimate result of these mutations would be an incorrectly folded and unstable cofactor molecule that is either poorly secreted and/or rapidly removed from circulation. There are,

**Figure 2.** Multiple partial alignments of factor V, factor VIII, and ceruloplasmin from different species around FVIII positions where novel mutations were found in the current work. For simplicity, only mutations within domain A1 and the A1-A2 linker (part A) and domains C1/C2 (part B) are represented; a complete alignment is available from the authors upon request. Strictly conserved residues are white with black shading, and conservative changes are shaded gray. Numberings refer to the mature human proteins. The activation cleavage site is indicated with an arrow in panel A, and loops important for membrane association are boxed in panel B. The secondary structure elements given below FV and ceruloplasmin sequences correspond to the crystal structures of bovine inactivated FVa (PDB 1SDD, Adams et al<sup>3</sup>), FVIII C2 domain (1D7P, Pratt et al<sup>3</sup>), as deposited in the corresponding PDB entries. Residues that are disordered in the crystal structure of ceruloplasmin are underlined.



however, differences in the potential impact of a particular mutation as a function of its location (eg, whether the residue is part of a regular secondary structure element or found within a loop) and the nature of the replacing residue (“Discussion”).

Within the second group, 4 of the identified mutations affect residues that are exposed on the cofactor surface, which therefore do not engage in important intradomain or interdomain interactions (see Figure 1B, where labels for these residues are boxed). Further, these mutations map to regions that are only poorly conserved in FV/FVIII and ceruloplasmin (Figure 2), also suggesting a functional role. These considerations together with functional evidence presented for some related replacements allow us to hypothesize that these 4 mutants would lead to properly folded but functionally defective cofactor molecules.

### Discussion

We have detected 31 novel mutations in the *F8* gene in Spanish HA patients, 9 of which were nonsense and small insertions and deletions. The deleterious mechanisms of these mutations are in general obvious given that they create premature termination codons leading to truncated *F8* mRNA and FVIII protein.<sup>43</sup> A particularly interesting case is mutation c.4155\_4195dup, which introduces a 41-bp tandem duplication starting at nucleotide 4056 in exon 14. This would in turn predict a stop codon 4 triplets after the beginning of the duplication (ie, following residue Thr1366). The truncated mutant protein would lack domains C1 and C2 along with the C-terminal part of the B domain and therefore, critical

**Table 1.** Novel nonsense, small deletions, small insertions, tandem duplications, and splice site mutations detected in Spanish HA patients

Exon/intron*	Mutation	Codon	Domain	Clinical severity	Inhibitors	Family history
8	c.1251insC	p.Leu398fsX7	A2	Severe	No	Sporadic
11	c.1682delA	p.Asp542fsX2	A2	Severe	No	Sporadic
14	c.2766delC	p.Ser903fsX2	B	Moderate	No	Positive
14	c.3093delAAGA	p.Lys1012fsX9	B	Severe	Yes	Positive
14	c.3557delT	p.Phe1167_8fsX31	B	Severe	No	Sporadic
14	c.4155_4195dup	p.Thr1366ThrfsX4	B	Severe	Yes	Sporadic
16	c.5508_5521del	p.Trp1817fsX32	A3	Severe	No	Sporadic
17	c.5805T>A	p.Tyr1916Stop	A3	Severe	?	Sporadic
20	c.6135G>T	p.Gly2026Stop	C1	Severe	No	Sporadic
13*	IVS13 a-2g	—	—	Severe	Yes	Sporadic
15*	IVS15 g-1c	—	—	Severe	No	Sporadic

\* indicates not available; and —, not applicable.



**Table 2. Novel missense mutations detected in Spanish HA patients**

Exon	Domain	Mutation		Clinical severity	Family history	Conservation in FVIII/FV/Cp	PolyPhen prediction	Predicted structural and/or functional implication
		Nucleotide	Protein					
2*	A1	c.248C>G	p.Pro64Arg	Mild	Positive	Yes/yes/no	Probably damaging	Impaired FX binding
4	A1	c.556G>A	p.Asp167Asn	Severe	Positive	Yes/yes/yes	Benign	Eliminates H-bond network/Disrupts domain structure
4	A1	c.584T>C	p.Leu176Pro	Severe	Sporadic	Yes/yes/yes	Possibly damaging	Creates cavity in protein core/disrupts secondary structure
6	A1	c.762A>G	p.Asn235Ser	Severe	Sporadic	Yes/yes/yes	Benign	Eliminates H-bond network/disrupts domain structure
6	A1	c.782T>C	p.Leu242Pro	Moderate	Sporadic	Yes/cons/yes	Possibly damaging	Creates cavity in protein core
7	A1	c.839G>A	p.Gly261Asp	Mild	Sporadic	Yes/no/yes	Possibly damaging	Introduces acidic side chain in unfavorable environment
8*	A2	c.1180G>T	p.Ala375Ser	Mild	Positive	Yes/no/no	Benign	Change at P <sub>3</sub> ' position/delayed factor VIII activation
9	A2	c.1421G>T	p.Gly455Val	Mild	NA	Yes/no/no	Probably damaging	Steric clashes with mostly aliphatic residues
10	A2	c.1487C>G	p.Pro477Arg	Severe	Sporadic	Yes/yes/yes	Probably damaging	Major disruption of protein core
11*	A2	c.1538G>T	p.Gly494Val	Moderate	Positive	Yes/no/no	Probably damaging	Impaired FX binding/enhanced binding to LRP
11	A2	c.1706C>G	p.Pro550Arg	Severe	Sporadic	Yes/no/yes	Probably damaging	Major disruption of protein core
13	A2	c.1910A>T	p.Asn618Ile	Moderate	Sporadic	Yes/yes/yes	Probably damaging	Eliminates stabilizing H-bond interactions
14	A3	c.5159C>T	p.Ala1701Val	Mild	Positive	Yes/yes/yes	Benign	Steric clashes with mostly aromatic or polar residues
15	A3	c.5286T>A	p.Phe1743Leu	Moderate	Sporadic	Yes/yes/yes	Possibly damaging	Creates small cavity in domain core/Disrupts loop conformation
22	C1	c.6301C>G	p.His2082Asp	Mild	Positive	Yes/no/—	Probably damaging	Disrupts interactions between domains A3 and C1
22	C1	c.6317A>C	p.Gln2087Pro	Severe	Positive	Yes/yes/—	Possibly damaging	Eliminates H-bond network/disrupts domain structure
22	C1	c.6427A>G	p.Met2124Val	Mild	Sporadic	Yes/yes/—	Possibly damaging	Creates small cavity in protein core
23	C1	c.6515C>T	p.Pro2153Leu	Severe	Positive	Yes/yes/—	Probably damaging	Disrupts protein core
25*	C2	c.6857A>G	p.Asp2267Gly	Mild	Sporadic	Yes/no/—	Possibly damaging	Impaired FX- and/or VWF-binding
26	C2	c.7006A>T	p.Ile2317Phe	Moderate	Positive	Yes/yes/—	Benign	Disrupts protein core

Cp indicates ceruloplasmin; H-bond, hydrogen bond; NA, not available; and —, not applicable.

\*Type II mutations (further explanation in "Type II mutations").

elements required for VWF association and membrane binding. As expected, all but one of these novel mutations were associated with a severe phenotype. However, one patient with mutation c.2766delC predicting a stop codon after residue Ser903 showed moderate HA. Transcription errors or ribosomal frameshifting may result in the production of full-length FVIII in this case, as previously reported for other mutations (Bogdanova et al<sup>44</sup> and references therein). The 2 novel splicing mutations were detected in patients with severe bleeding and are located at IVS13a-2g and IVS15g-1c affecting the specific consensus acceptor site. No RNA sample was available from these patients to confirm the effect of their mutations on splicing.

The predicted structural implications of the type I and type II novel missense changes are separately discussed below with emphasis on those positions where mutations of the same or topologically equivalent residues have previously been identified (Figure 3; Table 3; Table S1). Although the structural impact of these mutations was inferred from inspection of an FVIIIa homology model, quality and relatedness of substructures used as templates (crystal structures of human ceruloplasmin, human FVIII C2 domain, and bovine FVai) strongly support our analysis. In particular, most mutated residues are well conserved in FV and/or ceruloplasmin, and the effect of equivalent substitutions in the template structures can be directly assessed (Table S2).

#### Type I mutations

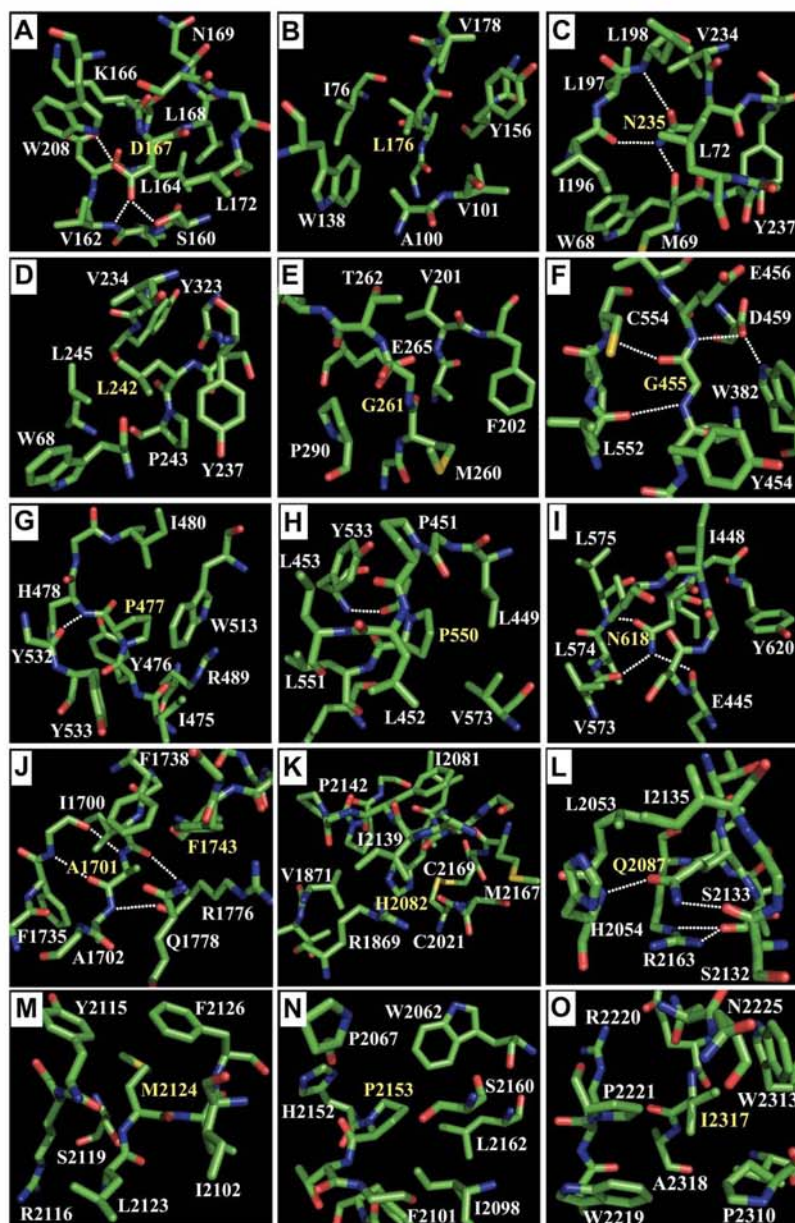
**Missense mutations that affect polar, albeit fully buried side chains.** The apparently conservative replacement of the strictly conserved Asp167 (Figure 2A) by an asparagine would disrupt a

complex network of stabilizing hydrogen bonds centered on Asp167 carboxylate (Figure 3A). All these H-bonds could not be simultaneously donated by the carboxamide group of an asparagine side chain, thus compromising domain A1 stability. Several different mutations have been previously identified at this and at topologically equivalent positions (Table 3). All well-characterized mutations were associated with severe phenotypes, as in p.Asp167Asn, with exception of the conservative replacement Asp→Glu.<sup>20</sup>

Residues Asn235 and Asn618, which occupy topologically equivalent positions in domains A1 and A2, were found mutated to serine and isoleucine, respectively. The carboxamide groups of these strictly conserved asparagine side chains engage in strong hydrogen bonds with main-chain atoms from distant polypeptide regions (compare Figure 3C and 3I). It is therefore not surprising that replacements by serine (instead of Asn235) or isoleucine (at position 618) destabilize the domain structures, and the patients presented severe and moderate HA, respectively. Again, disease severity is comparable with other mutations affecting these and the equivalent residue, Asn1922 (Table 3). Of note, the recombinantly expressed mutant p.Asn618Ser FVIII accumulates intracellularly,<sup>45</sup> and FVIII inhibitor development has been reported for patients carrying the Asn618Ser<sup>46</sup> and Asn1922Asp mutations.<sup>47</sup> Similar defects in protein secretion and inhibitor development might be expected for other mutations affecting Asn235, Asn618, or Asn1922, including the 2 novel mutations identified here.

Mutation p.His2082Asp represents the last example of a replacement that affects a polar residue. In the compact FVIIIa model, His2082 is essentially buried at the A3-C1 interface (Figure

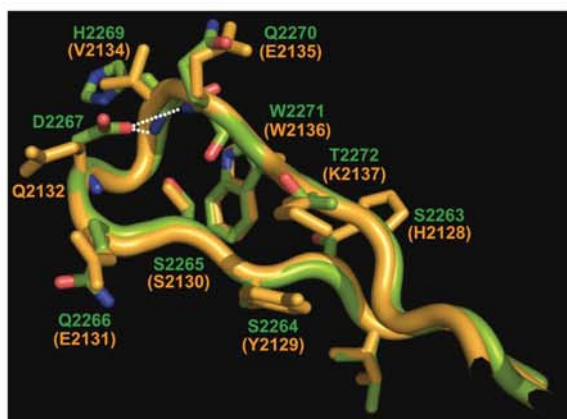
**Figure 3.** Close-up of novel, putative type I missense mutations identified in the current study. Atoms are color-coded (green indicates carbon; blue, nitrogen; red, oxygen; and yellow, sulfur), and the mutated residues are labeled yellow. With exception of Gly261 (E) and His2082 (K), only residues within 4 Å of the mutation are shown. Hydrogen bonds are indicated with dotted lines. Notice that most affected residues are fully buried in the protein core and engage in multiple interactions with surrounding residues. (Further explanation for each mutation is in "Type I mutations.")



1B); its imidazole ring engages in favorable interactions with residues from both domains (Figure 3K). Replacement by a negatively charged aspartate side chain would thus compromise the quaternary cofactor structure. On the other hand, formation of a salt bridge between Asp2082 and nearby Arg1869 might alleviate the consequences of this mutation, explaining the mild phenotype. We note that this residue has been alternatively hypothesized as part of a  $Mn^{2+}$ -binding site in the quaternary arrangement of FVIIIa that locates domain C1 close to A1.<sup>4</sup> Therefore, His2082 and neighboring residues represent a ground for a testable hypothesis about the prevalence of each conformation in circulating VWF-bound FVIII, its activated form, and FIXa-bound cofactor.

**Missense mutations affecting buried Pro or Gly residues.** Six of the 20 novel missense mutations identified in the current work either introduce a proline instead of a conserved or conservatively replaced hydrophobic residue (p.Leu176Pro, p.Leu242Pro, and p.Gln2087Pro;

Figure 2), or replace proline by arginine (at positions 477 and 550) or leucine (at 2153). The consequences of these mutations, however, depend on the precise location of the mutated residue. For instance, proline replacement for the strictly conserved Leu176 found in the middle of a major  $\beta$ -strand (Figures 2A,3B) would interfere with secondary structure formation. In addition, this change not only creates a cavity in the protein core, but also leads to clashes with residues from a neighboring strand (eg, Ser157). Thus, mutation p.Leu176Pro compromises cofactor folding at several levels; accordingly, it is associated with a severe bleeding phenotype, most likely related to absence of circulating FVIII. Severe HA results also from replacement of the strictly conserved Gln2087 by a proline (Figure 2B), as it disrupts an interaction network that clamps together sequentially distant polypeptide stretches of the C1 domain via strong H-bonds (Figure 3L). Interestingly, substitution of the equivalent Gln2246 by a polar arginine has been reported associated with moderate bleeding.<sup>48</sup>



**Figure 4.** Comparison of loop structures around FVIII C2 residue, Asp2267. The crystal structures of recombinant C2 domains from FV (Macedo-Ribeiro et al<sup>72</sup>) and FVIII (Pratt et al<sup>8</sup>) were superimposed, and residues around the mutated Asp2267 (FVIII) and the topologically equivalent Gln2132 (FV) are shown. The main chains of factors V and VIII are represented as orange and green ribbons, respectively. Only side chains of Gln2132/Asp2267 and surrounding residues are shown with all their nonhydrogen atoms; the side chains of FV are in orange and those of FVIII are color-coded as in Figure 3. Hydrogen bonds accepted from the Asp2267 carboxylate are indicated with dotted lines. Notice the complete equivalence of main-chain traces in the 2 cofactors, indicating that Asp2267 is dispensable for the observed loop conformation. Notice also that a large number of solvent-exposed side chains differ between the 2 cofactors, pointing to their involvement in specific protein-protein interactions. Inspection of the FVa/FVIIIa models suggests that these residues interact with substrates of the FVa/FIXa and FVIIIa/FIXa complexes, prothrombin and FX, respectively.

By contrast, the Leu242Pro replacement might be relatively well tolerated, as it does not affect a regular secondary structure element (Figure 2A). Moreover, a proline at this position retains favorable contacts with hydrophobic core residues while producing only minor clashes with the preceding Ser241. Finally, residues surrounding Leu242 are partially exposed and could be displaced to accommodate the mutant side chain (Figure 3D). These observations are in line with the moderate bleeding episodes described in this patient and with the mild disease form associated with the more conservative substitution, p.Leu625Val.<sup>49</sup>

On the other hand, insertion of bulky, basic arginine side chains instead of strictly (Pro477) or well-conserved (Pro550) proline residues that are fully buried in the protein core (Figure 3G,H, respectively) would result in major disruption of the A2 domain fold, explaining the severe phenotypes of these patients. Similar phenotypes are associated with previously reported mutations of the Pro550-equivalent residue, Pro1854 (Table 3). We also note that these residues are found within repeated, well-conserved Gly-(Phe/Leu/Ile)-(Leu/Ile)-Gly-Pro motifs that appear to be critical for proper folding and trafficking of A domains.<sup>50</sup>

Although apparently less deleterious, the strictly conserved Pro2153 (Figure 2B) is also buried in the protein core, and introduction of a bulkier, albeit aliphatic side chain (Leu) leads to major clashes with other core residues (Figure 3N). Gross fold destabilization would explain the severe bleeding associated with this mutation. Previous mutations of residue Pro2153 to Gln<sup>48,51</sup> and Arg<sup>52,53</sup> have been reported. It could have been expected that introduction of a polar side chain at this position has even more dramatic consequences than the Pro→Leu replacement identified here, and indeed p.Pro2153Arg is associated with severe HA.<sup>52,53</sup> However, replacement by a glutamine results in mild<sup>51</sup> or moderate HA,<sup>48</sup> which is explained because the carboxamide group of Gln2153 could engage in H-bonding interactions with side chains of nearby polar residues (Figure 3N) compensating for steric

clashes. The latter mutation has been previously associated with a reduced FVIII binding to von Willebrand factor.<sup>51</sup> Because Pro2153 is essentially buried in the domain core, it is unlikely to engage in direct contacts with the carrier protein. On the other hand, we note that the neighboring residue, Arg2150 (C $\alpha$ -C $\alpha$  distance: 10 Å), is part of an important VWF-binding epitope.<sup>54</sup> The observed impairment in VWF binding caused by replacement Pro2153Gln most probably results from enforced displacements of Arg2150 and surrounding residues. Conceivably, mutation p.Pro2153Leu also leads to impaired VWF binding and rapid cofactor clearance from blood, contributing to the severe phenotype.

Two mutations that affect glycine residues conserved in FVIII, p.Gly261Asp (Figure 2A) and p.Gly455Val, result in a mild bleeding phenotype. We note that small side chains are well tolerated at these positions given that topologically equivalent residues in FV and in other FVIII domains are Ala, Ser, or Thr. However, insertion of a charged aspartate at position 261 is unfavorable, mainly because of electrostatic repulsion from the nearby Glu265 (Figure 3E). Similarly, the replacement of Gly455 by Val would predict several, albeit minor, clashes with side chains of both nearby and sequentially distant residues (Figure 3F). Nevertheless, in both cases neighboring residues possess enough freedom to rotate away and alleviate these unfavorable interactions. In addition, introduction of Asp261 could be partially compensated by donating hydrogen bonds to the main-chain nitrogen atoms of Val201 and/or Phe202. The more severe phenotypes associated with 2 further mutations at position 455 (p.Gly455Glu, Waseem et al<sup>55</sup> and p.Gly455Arg, Freson et al<sup>49</sup>) are explained by unfavorable van der Waals contacts of these bulkier, polar side chains in a mostly aromatic/hydrophobic environment. Moreover, the negatively charged side chain of Glu455 would be repelled by the Asp459 carboxylate (Figure 3F).

**Conservative replacements of buried hydrophobic residues.** Replacement of the partially buried, strictly conserved Met2124 by a valine (Figure 2B) would minimally affect domain structure (Figure 3M), and the proband presented mild bleeding. Because of the conservative nature of mutations p.Ala1701Val, p.Phe1743Leu, and p.Ile2317Phe, they would also seem to be less detrimental. However, in these cases, the precise location of the mutated residue determines disease severity. Although introduction of the bulkier Val side chain at position 1701 leads to clashes with several residues (Figure 3J), the well-exposed Gln1778 side chain might rotate away to accommodate the extra methyl groups from Val1701. The replacement Ala1701Val, associated with mild HA, would have less dramatic implications than the p.Ala1701Asp mutation described in a severe case.<sup>15</sup>

Similarly, mutation c.5286T>A that predicts replacement of the strictly conserved Phe1743 by the aliphatic leucine in a poorly conserved loop would seem to be well tolerated (Figure 3J). Indeed, mutation c.5284T>C leading to the same amino acid exchange has been previously reported in a patient suffering from mild bleeding.<sup>56</sup> However, the fact that our proband presented moderate HA suggests that lack of loop-stabilizing interactions mediated by the Phe1743 side chain might disrupt the proper structure of the convoluted Phe1738-Tyr1762 loop. We hypothesize that this could in turn affect interactions with domain C1, or intermolecular contacts with FIXa (Figure 1B).

By contrast, mutation p.Ile2317Phe introduces a bulkier phenyl moiety instead of the strictly conserved aliphatic side chain at position 2317 (Figure 2B), and would lead to severe clashes with other conserved residues (Figure 3O). Aside from

From [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org) at CSIC - Unidad Coordinación Bibliotecas on March 27, 2008. For personal use only. NOVEL MISSENSE MUTATIONS IN SPANISH HA PATIENTS 3475

**Table 3. Comparison of novel missense mutations in Spanish HA patients with previously reported replacements at the same or topologically equivalent positions**

Mutation/equivalent mutations	FVIII:C, %	FVIII:Ag, %	Clinical severity	Inhibitor?	Reference
<b>p.Asp167Asn</b>					
p.Asp167Tyr	<1	1.6	Moderate†	No	Liu et al <sup>68</sup>
p.Asp167Glu	9-15	5	Mild	?	Boekhorst et al <sup>19</sup>
p.Asp167Gly	?	?	Mild‡	?	Cutler et al <sup>74</sup>
p.Asp542Tyr	<1	<1	Severe	No	Akkarapatumwong et al <sup>75</sup>
p.Asp542Gly	<1	5	Severe	No	Higuchi et al <sup>76</sup> ; McGinniss et al <sup>77</sup>
p.Asp542His	<1	?	Severe	No	Waseem et al <sup>55</sup> ; Bogdanova et al <sup>78</sup>
p.Asp542Ala	<1	?	Severe	No	Tagariello et al, unpublished§
p.Asp1846Tyr	<1	?	Severe	No	Becker et al <sup>79</sup>
p.Asp1846Asn	<1	?	Severe	No	Becker et al <sup>79</sup>
p.Asp1846Gly	<1	?	Severe	No	Casana et al <sup>80</sup>
p.Asp1846Glu	<1	?	Severe	No	Ljung et al, unpublished§
<b>p.Asn235Ser</b>					
p.Asn235Ile	<1	?	Severe	?	Biococchi et al <sup>81</sup>
p.Asn235Asp	<1	?	Severe	No	Ljung et al, unpublished§
<b>p.Asn618Ile</b>					
p.Asn618Asp	?	?	Severe	?	Leuer et al <sup>53</sup>
p.Asn618Asp	?	?	Moderate	?	Arruda et al <sup>82</sup>
p.Asn618Ser	31	22	Mild	?	Roelse et al <sup>45</sup>
p.Asn618Ser	30	?	Mild	Yes	Vlot et al <sup>46</sup>
p.Asn618Ser	?	?	Mild	?	Boekhorst <sup>19</sup>
p.Asn618Ser	<1	?	Severe	No	Ljung et al, unpublished§
p.Asn1922Asp	<1	?	Severe	Yes	Traystman et al <sup>47</sup>
p.Asn1922Asp	?	?	Moderate	?	Higuchi et al <sup>76</sup>
p.Asn1922Ser	?	?	Severe	?	Higuchi et al <sup>76</sup>
p.Asn1922Ser	?	?	Moderate	?	Diamond et al <sup>83</sup>
<b>p.Leu242Pro</b>					
p.Leu625Val	8-12	?	Mild	No	Freson et al <sup>49</sup> ; Gallardo et al, unpublished§
p.Leu625Ser	<1	1	Severe	No	Guillet et al <sup>15</sup>
p.Leu1929Pro	?	?	?	?	Cutler et al <sup>74</sup>
<b>p.Gly261Asp</b>					
p.Gly643Ala*	<1	?	Severe	No	Gallardo et al, unpublished§
p.Gly1948Asp	7	49	Mild/moderate	No	David et al <sup>18</sup>
p.Gly1948Arg	12	?	Mild	No	Ljung et al, unpublished§
<b>p.Gly455Val</b>					
p.Ala78Pro	<1	?	Severe	Yes	Sukarova-Stefanovska et al <sup>84</sup>
p.Gly455Glu	1	?	Severe	Yes	Waseem et al <sup>55</sup> ; Vinciguerra et al <sup>85</sup>
p.Gly455Arg	<1	?	Severe	No	Freson et al <sup>49</sup>
p.Gly494Val; p.Gly494Ser	4	23	Moderate	Yes	Liu et al <sup>68</sup>
<b>p.Pro550Arg</b>					
p.Ala175Thr	30	?	Mild	No	Guillet et al <sup>15</sup>
p.Pro1854Arg	<1	?	Severe	No	Bogdanova et al <sup>78</sup> ; Becker et al <sup>79</sup>
p.Pro1854Leu	?	?	Mild	?	Lillicrap et al, unpublished§
p.Ala1701Val; p.Ala1701Asp	<1	1	Severe	No	David et al <sup>14</sup>
<b>p.Phe1743Leu</b>					
p.Phe436Cys	3	?	Moderate	No	Cutler et al <sup>74</sup>
p.Phe436Cys	?	?	Mild/moderate	?	Bogdanova <sup>86</sup>
p.Phe1743Leu	8	?	Mild	?	Ahmed et al <sup>56</sup>
<b>p.Gln2087Pro</b>					
p.Gln2246Arg	4	4	Moderate	No	Schwaab et al <sup>48</sup>
p.Glu2248Arg	?	?	Mild/moderate	?	Boekhorst et al <sup>19</sup>
p.Gln2246Lys	10	4	Mild	No	David et al <sup>14</sup>
<b>p.Pro2153Leu</b>					
p.Pro2153Gln	3	6	Moderate	No	Schwaab et al <sup>48</sup>
p.Pro2153Glu	2	<5	Mild/moderate	?	Jacquemin et al <sup>51</sup>
p.Pro2153Arg	<1	<1	Severe	No	Ivaskevicius et al <sup>52</sup> ; Leuer et al <sup>53</sup>
p.Pro2310Leu	<1	?	Severe	No	Bogdanova et al <sup>78</sup>
p.Ile2317Phe; p.Ser2160Arg	5	?	Moderate	?	Ahmed et al <sup>56</sup>

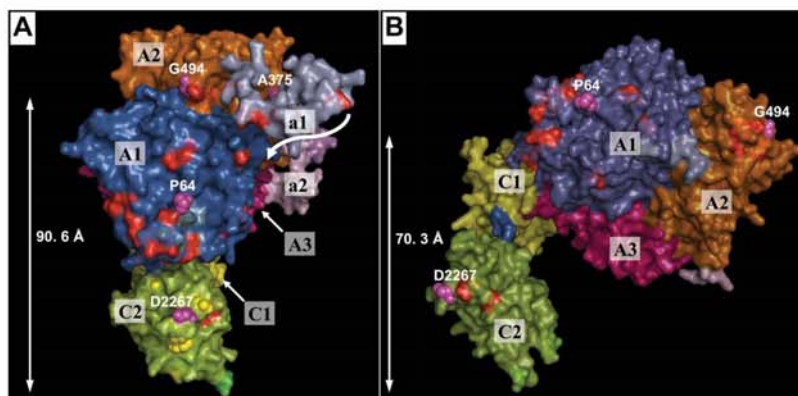
? indicates not available.

\*Mutation at the topologically equivalent position in human ceruloplasmin A2 domain, p.Gly631Arg, leads to impaired copper incorporation.<sup>45</sup>

†Reported as "severe" in the HAMS TeRS database.

‡Reported as "moderate" in the HAMS TeRS database. Altogether, absence of a fold-stabilizing side chain and cavity formation at this position appear to have less deleterious effects on the domain structure than clashes between side chains other than Asp and neighboring residues, in particular Trp208 (Figure 3A; Table S1).

§Unpublished work included in this table has been deposited with the HAMS TeRS database.



**Figure 5.** Location of solvent-exposed mutations on the FVIIIa surface. Solid surface representation of the 2 hypothesized quaternary arrangements of human FVIIIa, the "compact" (A) and "extended" models (B). Domains are labeled, and the distances from the phospholipid membrane are indicated (calculated as minimum distances between the C-terminal Cys residue in domain A1, Cys329, to a plane passing through C $\alpha$  atoms of membrane-binding residues in C2, Met2199, Phe2200, and Leu2252). The side chains of 4 novel mutations affecting exposed residues, Pro64, Ala375, Gly494, and Asp2267, are represented as light magenta spheres. In addition, several residues previously reported to participate in VWF binding are highlighted as yellow spheres; other reported but not characterized mutations affecting exposed residues are in red. A curved arrow points to the probable displacement of C-terminal residues from the a1 linker to a more extended conformation after cleavage of the Arg372-Ser373 peptide bond. This would bring further residues implicated in FX binding (eg, the triplet of acidic residues Asp361/Asp362/Asp363; Nogami et al<sup>7</sup>) closer to the putative substrate binding site.

destabilizing important structural elements, loop rearrangements enforced by the inserted Phe2317 benzene ring could compromise interactions with VWF and/or membrane binding mediated by the C2 domain explaining the moderate bleeding phenotype associated with this mutation.

#### Type II mutations

Mutation p.Ala375Ser conservatively replaces the P<sub>3</sub>' position within the activation cleavage site that separates domains A1 and A2. Previously, several mutations of the critical P<sub>1</sub> residue Arg372 have been reported<sup>57-61</sup> with phenotypes ranging from mild to severe. Replacement of the P<sub>1</sub>' (p.Ser373Leu and p.Ser373Pro)<sup>62,63</sup> and P<sub>2</sub> residues (p.Ile371Thr)<sup>16</sup> also compromises cleavage at this site and results in mild bleeding tendencies. Inspection of the thrombin structure,<sup>64,65</sup> together with work conducted using synthetic peptide libraries<sup>66</sup> and phage display,<sup>67</sup> suggests a minor influence of positions on the nonprimed side of the P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>' scissile peptide bond. In fact, serine appears to be slightly preferred over Ala at P<sub>3</sub>' position, at least for thrombin inhibitors. However, these studies do not consider the key role played by interactions between thrombin exosites and acidic a1-a3 peptides during FVIII recognition and processing (eg, Glu331 to Asp363 for cleavage after Arg372). It is therefore conceivable that the mild bleeding phenotype associated with mutation p.Ala375Ser is due to a slightly decreased rate of cofactor activation.

Three additional mutations associated with mild or moderate bleeding phenotypes appear to either extend previously characterized or define novel protein-protein binding sites, based on their proximity to known interaction regions (Figure 1B). Mutation p.Pro64Arg replaces a proline conserved in FV and FVIII by a basic arginine side chain. By contrast, the topologically equivalent position is occupied by a glutamate or an aspartate in ceruloplasmin (Figure 2A), and the polar glutamate side chain is fully exposed in the crystal structure of the ferroxidase.<sup>9</sup> Accordingly, inspection of the FVIIIa model revealed that an arginine side chain would be tolerated at this position. Because most residues within the long, irregular loop Thr55-Pro67 are well exposed, and considering their proximity to a1 (Figures 1B,5), it is conceivable that this area represents a binding site for substrate FX, which is partially masked by the mutant Arg64 side chain. Similar considerations

apply to the p.Ala62Asp mutation, which has been reported in mild HA patients.<sup>16,17</sup> Finally, and also in line with the hypothetical role of this region as a FX-interactive site, more dramatic loop rearrangements due to in-frame deletion of Pro66 or the Arg65/Pro66 pair lead to moderately severe and severe HA, respectively.<sup>68</sup> Considering the predicted distance from the phospholipid membrane (Figure 1B), we speculate that this loop interacts with EGF2 and/or serine protease domains of substrate FX.

Mutation p.Gly494Val maps to a particularly mobile, surface-exposed loop,<sup>9</sup> which represents the major inhibitor epitope in FVIII A2 domain.<sup>69</sup> Interestingly, both residues preceding and following Gly494 have been implicated in FX binding, in particular the basic cluster Arg489/Arg490/Lys493.<sup>4,70</sup> It is conceivable that a bulkier side chain at position 494 would impair these FVIIIa-FX interactions, thus compromising substrate recognition. Moderate bleeding has also been reported for mutant p.Gly494Ser,<sup>68</sup> also in line with the proposed involvement of this loop in FX activation. We note that a discrepancy between antigen and FVIII activity levels for the latter mutant (23% and 4%, respectively) suggests its involvement in intermolecular interactions. As alternative to FX binding, and because the 484 to 509 loop represents a major binding site for low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP),<sup>4,71</sup> our mutation p.Gly494Val could reduce the half-life of circulating FVIII by enhancing binding to its hepatic clearance receptor.

Finally, mutation p.Asp2267Gly eliminates a partially exposed aspartate side chain within a loop that is poorly conserved between FV and FVIII (Figure 2B). One of the carboxylate oxygens from Asp2267 accepts hydrogen bonds from the main-chain nitrogen atoms of 2 consecutive loop residues (Figure 4). The topologically equivalent position, however, is occupied by Gln/Arg in FV (Figure 2B), and in spite of this fact the loop conformation is almost identical in all the experimentally solved structures of natural or recombinant C2 domains, both from FV<sup>2,72</sup> and FVIII<sup>8,41</sup> (Figure 4). Therefore, Asp2267 appears to be dispensable for C2 structural stability. Inspection of the model suggests that most residues within the convoluted, bowtie-shaped Gln2266-Lys2281 loop are well exposed in FVIIIa, and are thus available for intermolecular interactions (Figure 2B). In this regard, we also noticed that this region is the most variable between FV and FVIII discoidin-like

domains (Figure 4), pointing to a cofactor-specific role. In the light of its neighborhood to other residues previously associated with VWF binding<sup>11,73</sup> (Figure 5), this area might represent an extension of the well-characterized VWF-binding site(s). Alternatively, and given the relatively close distance to the phospholipid membrane (Figures 1B and 5), residues from this loop and in particular Asp2267 might contact the Gla or EGF1 domains from substrate FX.

In conclusion, we characterized 31 novel mutations in the *F8* gene including a further evaluation and interpretation of 20 novel missense mutations combining bioinformatics tools and current knowledge of FV/FVIII structure/function relationships. Our thorough analysis of the novel mutations provides further insights into the causes of hemophilia A, contributes to a better understanding of the functional consequences of *F8* mutations, and suggests novel FX-interaction areas on the cofactor surface. Future investigations using recombinant proteins should validate these results, and refine current models for FVIIIa and FVIIIa $\cdot$ FIXa (Xase) structures.

## Acknowledgments

We thank all patients and their relatives for participating in this study. We are indebted to A. Alonso, C. Altisent, M. T. Calvo, L.

Eciolaza, J. Fontcuberta, R. González Boulosa, F. Lucía, M. A. Lopez Aristegui, M. F. López Fernández, J. Martorell, J. Monteagudo, M. Moreno, R. Pérez Garrido, M. Quintana, J. Rosell, C. Sedano, J. Tusell, F. Velasco, and A. Villar for clinical information about these patients.

This work was supported by Fundació Catalana d'Hemofilia and grant SAF2004-00543 from Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

## Authorship

Contribution: A.V., P.F.-P., and E.F.T. designed the research, analyzed data, and wrote the paper; P.F.-P. and M.A.C.-R. performed modeling and produced figures; M. Baena, M.C., and M.D. performed experiments to identify mutations; M. Baiget gave intellectual support and discussion on the paper; E.F.T. was primarily responsible for this work.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Eduardo F. Tizzano, Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Ma. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain; e-mail: etizzano@santpau.es.

## References

- White GC 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, et al. Definitions in hemophilia: recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the International Society on Thrombosis and Haemostasis [letter]. *Thromb Haemost*. 2001;85:560.
- Adams TE, Hockin MF, Mann KG, Everse SJ. The crystal structure of activated protein C-inactivated bovine factor Va: Implications for cofactor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:8918-8923.
- Shen BW, Spiegel PC, Chang C-H, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood*. 2008;111:1240-1247.
- Fay PJ, Jenkins PV. Mutating factor VIII: lessons from structure to function. *Blood Rev*. 2005;19:15-27.
- Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet*. 2005;6:488-501.
- Lapan KA, Fay PJ. Localization of a Factor X interactive site in the A1 subunit of Factor VIIIa. *J Biol Chem*. 1997;272:2082-2088.
- Nogami K, Freas J, Maniathy C, Wakabayashi H, Rezaie AR, Fay PJ. Mechanisms of interactions of Factor X and Factor Xa with the acidic region in the Factor VIII A1 domain. *J Biol Chem*. 2004;279:33104-33113.
- Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL. Structure of the C2 domain of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å resolution. *Nature*. 1999;402:439-442.
- Zaitseva I, Zaitsev V, Card G, et al. The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å resolution: Nature of the copper centres. *J Biol Inorg Chem*. 1996;1:15-23.
- Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tud-denham EGD, Kemball-Cook G. A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood*. 1997;89:2413-2421.
- Liu M-L, Shen BW, Nakaya S, et al. Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-Ångström human C2-domain crystal structure. *Blood*. 2000;96:979-987.
- Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kemball-Cook G, Holzenburg A. 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood*. 2002;99:1215-1223.
- Autin L, Miteva MA, Lee WH, Mertens K, Radtke KP, Villoutreix BO. Molecular models of the procoagulant Factor VIIIa-Factor IXa complex. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2044-2056.
- HAMSTeRS Database. <http://europium.csc.mrc.ac.uk>, accessed November 18, 2007.
- David D, Ventura C, Moreira I, et al. The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients. *Haematologica*. 2006;91:840-843.
- Guillet B, Lambert T, d'Oiron R, et al. Detection of 95 novel mutations in coagulation factor VIII gene F8 responsible for hemophilia A: results from a single institution. *Hum Mutat*. 2006;27:676-685.
- Repepe Y, Slaoui M, Ferrandiz D, et al. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J Thromb Haemost*. 2007;5:1469-1476.
- Rossetti LC, Radic CP, Candela M, et al. Sixteen novel hemophilia A causative mutations in the first Argentinian series of severe molecular defects. *Haematologica*. 2007;92:842-845.
- David D, Moreira I, Lalloz MRA, et al. Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994;5:257-264.
- Boekhorst J, Verbruggen B, Lavergne JM, et al. Thirteen novel mutations in the factor VIII gene in the Nijmegen haemophilia A patient population. *Brit J Haematol*. 2005;131:109-117.
- National Institutes of Health. GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>, accessed August 17, 2007.
- Den Dunnen J, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*. 2001;109:121-124.
- Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. *Biochem Biophys Res Com*. 1967;27:157-162.
- Parthiban V, Gromiha MM, Schomburg D. CUP-SAT: prediction of protein stability upon point mutations. *Nucl Acids Res*. 2006;34:W239-W242.
- SWISS-MODEL Database. <http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>, accessed August 17, 2007.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl Acids Res*. 2003;31:3381-3385.
- Protein Database (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, accessed August 17, 2007).
- Kamata K, Kawamoto H, Honma T, Iwama T, Kim S-H. Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6630-6635.
- Mizuno H, Fujimoto Z, Atoda H, Morita T. Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:7230-7234.
- Sunnerhagen M, Olah GA, Stenflo J, Forsen S, Drakenberg T, Trewthella J. The relative orientation of Gla and EGF domains in coagulation factor X is altered by Ca<sup>2+</sup> binding to the first EGF domain: a combined NMR-small angle X-ray scattering study. *Biochemistry*. 1996;35:11547-11559.
- Wang D, Bode W, Huber R. Bovine chymotrypsinogen A X-ray crystal structure analysis and refinement of a new crystal form at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*. 1985;185:595-624.
- Brandstetter H, Bauer M, Huber R, Lollar P, Bode W. X-ray structure of clotting factor IXa: active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:9796-9800.
- Shikamoto Y, Morita T, Fujimoto Z, Mizuno H. Crystal structure of Mg<sup>2+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-bound Gla domain of Factor IX complexed with binding protein. *J Biol Chem*. 2003;278:24090-24094.
- Huang M, Furie BC, Furie B. Crystal structure of the calcium-stabilized human Factor IX Gla domain bound to a conformation-specific anti-factor

From [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org) at CSIC - Unidad Coordinación Bibliotecas on March 27, 2008. For personal use only.

3478 VENCESLÁ et al

BLOOD, 1 APRIL 2008 • VOLUME 111, NUMBER 7

- IX antibody. *J Biol Chem*. 2004;279:14338-14346.
35. Venkateswarlu D, Perera L, Darden T, Pedersen LG. Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys J*. 2002;82:1190-1206.
36. Ansong C, Fay PJ. Factor VIII A3 domain residues 1954-1961 represent an A1 domain-interactive site. *Biochemistry*. 2005;44:8850-8857.
37. Kim SW, Quinn-Allen MA, Camp JT, et al. Identification of functionally important amino acid residues within the C2-domain of human factor V using alanine-scanning mutagenesis. *Biochemistry*. 2000;39:1951-1958.
38. Saleh M, Peng W, Quinn-Allen MA, et al. The factor V C1 domain is involved in membrane binding: identification of functionally important amino acid residues within the C1 domain of factor V using alanine scanning mutagenesis. *Thromb Haemost*. 2004;91:16-27.
39. Nicolaes GA, Villoutreix BO, Dahlback B. Mutations in a potential phospholipid binding loop in the C2 domain of factor V affecting the assembly of the prothrombinase complex. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2000;11:89-100.
40. Barrow RT, Healey JF, Jacquemin MG, Saint-Remy JMR, Lollar P. Antigenicity of putative phospholipid membrane-binding residues in factor VIII. *Blood*. 2001;97:169-174.
41. Spiegel PC Jr, Jacquemin M, Saint-Remy J-MR, Stoddard BL, Pratt KP. Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4{kappa} Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. *Blood*. 2001;98:13-19.
42. Fuentes-Prior P, Fujikawa K, Pratt KP. New insights into binding interfaces of coagulation factors V and VIII and their homologues lessons from high resolution crystal structures. *Curr Protein Pept Sci*. 2002;3:313-339.
43. David D, Santos IMA, Johnson K, Tuddenham EGD, McVey JH. Analysis of the consequences of premature termination codons within factor VIII coding sequences. *J Thromb Haemost*. 2003;1:139-146.
44. Bogdanova N, Markoff A, Eisert R, et al. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with mild and moderate hemophilia A. *Hum Mutat*. 2007;28:54-60.
45. Roelse JC, de Laaf RT, Timmermans SM, Peters M, van Mourik JA, Voorberg J. Intracellular accumulation of factor VIII induced by missense mutations Arg593→Cys and Asn618→Ser explains cross-reacting material-reduced hemophilia A. *Br J Haematol*. 2000;108:241-246.
46. Vlot AJ, Wittebol S, Strengers PFW, et al. Factor VIII inhibitor in a patient with mild hemophilia A and an Asn618→Ser mutation responsive to immune tolerance induction and cyclophosphamide. *Br J Haematol*. 2002;117:136-140.
47. Traystman MD, Higuchi M, Kasper CK, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr. Use of denaturing gradient gel electrophoresis to detect point mutations in the factor VIII gene. *Genomics*. 1990;6:293-301.
48. Schwaab R, Oldenburg J, Schwaab U, et al. Characterization of mutations within the factor VIII gene of 73 unrelated mild and moderate hemophiliacs. *Br J Haematol*. 1995;91:458-464.
49. Freson K, Peerlinck K, Aguirre T, et al. Fluorescent chemical cleavage of mismatches for efficient screening of the factor VIII gene. *Hum Mutat*. 1998;11:470-479.
50. Kono S, Miyajima H. Molecular and pathological basis of aceruloplasminemia. *Biol Res*. 2006;39:15-23.
51. Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, et al. 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.
52. Ivaskевичius V, Jurgutis R, Rost S, et al. Lithuanian hemophilia A and B registry comprising phenotypic and genotypic data. *Br J Haematol*. 2001;112:1062-1070.
53. Leuer M, Oldenburg J, Lavergne J-M, et al. Somatic mosaicism in hemophilia A: a fairly common event. *Am J Hum Genet*. 2001;69:75-87.
54. Jacquemin M, Benhida A, Peerlinck K, et al. A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood*. 2000;95:156-163.
55. Waseem NH, Bagnall R, Green PM, Giannelli F. Start of UK confidential hemophilia A database: analysis of 142 patients by solid phase fluorescent chemical cleavage of mismatch. *Thromb Haemost*. 1999;81:900-905.
56. Ahmed RP, Ivaskевичius V, Kannan M, Seifried E, Oldenburg J, Saxena R. Identification of 32 novel mutations in the factor VIII gene in Indian patients with hemophilia A. *Haematologica*. 2005;90:283-284.
57. Bicocchi MP, Migeon BR, Pasino M, et al. Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting hemophilia A. *Eur J Hum Genet*. 2005;13:635-640.
58. Arai M, Inaba H, Higuchi M, et al. Direct characterization of Factor VIII in plasma: Detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine-372→histidine). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:4277-4281.
59. Pattinson JK, Millar DS, McVey JH, et al. The molecular genetic analysis of hemophilia A: a directed search strategy for the detection of point mutations in the human factor VIII gene. *Blood*. 1990;76:2242-2248.
60. Shima M, Ware J, Yoshioka A, Fukui H, Fulcher CA. An arginine to cysteine amino acid substitution at a critical thrombin cleavage site in a dysfunctional factor VIII molecule. *Blood*. 1989;74:1612-1617.
61. Lavergne JM, Bahnak BR, Vidaud M, Laurian Y, Meyer D. A directed search for mutations in hemophilia A using restriction enzyme analysis and denaturing gradient gel electrophoresis: a study of seven exons in the factor VIII gene of 170 cases. *Notul Rev Fr Hematol*. 1992;34:85-91.
62. Acquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Molinari AC, Bicocchi MP. Two novel mutations at 373 codon of FVIII gene detected by DGGG. *Thromb Haemost*. 1993;69:392-393.
63. Johnson DJ, Pemberton S, Acquila M, Mori PG, Tuddenham EG, O'Brien DP. Factor VIII S373L: mutation at P1' site confers thrombin cleavage resistance, causing mild hemophilia A. *Thromb Haemost*. 1994;71:428-433.
64. Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR, Hofsteenge J. The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trip insertion segment. *EMBO J*. 1989;8:3467-3475.
65. Bode W, Turk D, Karshikov A. The refined 1.9 Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci*. 1992;1:426-471.
66. Petrassi HM, Williams JA, Li J, et al. A strategy to profile prime and non-prime proteolytic substrate specificity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15:3162-3166.
67. Su Z, Vinogradova A, Koutychenko A, Tolkachev D, Ni F. Rational design and selection of bivalent peptide ligands of thrombin incorporating P4-P1 tetrapeptide sequences: from good substrates to potent inhibitors. *Protein Eng Des Sel*. 2004;17:647-657.
68. Liu M-L, Nakaya S, Thompson AR. Non-inversion Factor VIII mutations in 80 hemophilia A families including 24 with alloimmune responses. *Thromb Haemost*. 2002;87:273-276.
69. Lubin IM, Healey JF, Barrow RT, Scandella D, Lollar P. Analysis of the human Factor VIII A2 inhibitor epitope by alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem*. 1997;272:30191-30195.
70. Jenkins PV, Dill JL, Zhou C, Fay PJ. Clustered basic residues within segment 484-510 of the factor VIII A2 subunit contribute to the catalytic efficiency for factor Xa generation. *J Thromb Haemost*. 2004;2:452-458.
71. Sarafanov AG, Makogonenko EM, Pechik IV, et al. Identification of coagulation factor VIII A2 domain residues forming the binding epitope for Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein. *Biochemistry*. 2006;45:1829-1840.
72. Macedo-Ribeiro S, Bode W, Huber R, et al. Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. *Nature*. 1999;402:434-439.
73. Spiegel PC, Murphy P, Stoddard BL. Surface-exposed hemophilic mutations across the Factor VIII C2 domain have variable effects on stability and binding activities. *J Biol Chem*. 2004;279:53691-53698.
74. Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, Savidge GF. The identification and classification of 41 novel mutations in the factor VIII gene (F8C). *Hum Mutat*. 2002;19:274-278.
75. Akkarapatumwong V, Oranwiroon S, Pung-amritt P, et al. Mutations of the factor VIII gene in Thai hemophilia A patients. *Hum Mutat*. 2000;15:117-118.
76. Higuchi M, Kazazian HH Jr, Kasch L, et al. Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the Factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:7405-7409.
77. McGinniss MJ, Kazazian HH Jr, Hoyer LW, Bi L, Inaba H, Antonarakis SE. Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A. *Genomics*. 1993;15:392-398.
78. Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, et al. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat*. 2005;26:249-254.
79. Becker J, Schwaab R, Moeller-Taube A, et al. Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type-dependent sex ratio of mutation frequencies. *Am J Hum Genet*. 1996;58:657-670.
80. Casana P, Haya S, Cid AR, et al. Abstract PO11. *Haemophilia*. 2004;10:73-78.
81. Bicocchi MP, Pasino M, Lanza T, et al. Analysis of 18 novel mutations in the factor VIII gene. *Br J Haematol*. 2003;122:810-817.
82. Arruda VR, Pieneman WC, Reitsma PH, et al. Eleven novel mutations in the factor VIII gene from Brazilian hemophilia A patients. *Blood*. 1995;86:3015-3020.
83. Diamond C, Kogan S, Levinson B, Gitschier J. Amino acid substitutions in conserved domains of factor VIII and related proteins: study of patients with mild and moderately severe hemophilia A. *Hum Mutat*. 1992;1:248-257.
84. Sukarova-Stefanovska E, Zisovski N, Muratovska O, Kostova S, Efremov GD. Three novel point mutations causing hemophilia A. *Haemophilia*. 2002;8:715-718.
85. Vinciguerra C, Zawadzki C, Dargaud Y, et al. Characterisation of 96 mutations in 128 unrelated severe hemophilia A patients from France: description of 62 novel mutations. *Thromb Haemost*. 2006;95:593-599.
86. Bogdanova N, Lemcke B, Markoff A, et al. Seven novel and four recurrent point mutations in the factor VIII (F8C) gene. *Hum Mutat*. 2001;18:546 [letter].

**Supplemental Table 1: Structural impact of missense mutations detected in the current study and comparison with previously identified mutations.** Mutations are classified as fold-stabilizing (S) or destabilizing (D), and the torsion angles as favorable (F) or unfavorable (U). (As assessed with CUPSAT). Unless otherwise indicated, values for  $\Delta\Delta G$  apply to thermal stability of the mutant protein, as compared to wild-type.

Mutation	Overall effect	Torsion	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Mutation of the same codon	Overall effect	Torsion	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
<b>p.Pro64Arg</b>	<b>S</b>	<b>U</b>	<b>-1.02</b>	—	—	—	—
p.Asp167Asn	S	U	-0.02 <sup>a</sup>	p.Asp167Tyr p.Asp167Glu p.Asp167Gly	D D S	U F U	4.04 <sup>a</sup> 1.53 <sup>a</sup> -5.29 <sup>a</sup>
p.Leu176Pro	D	U	7.73	—	—	—	—
p.Asn235Ser	D	F	2.35	p.Asn235Ile	D	U	6.24
p.Leu242Pro	D	F	1.26	—	—	—	—
p.Gly261Asp	D	U	0.67	—	—	—	—
<b>p.Ala375Ser</b>	<b>S</b>	<b>U</b>	<b>-0.84</b>	—	—	—	—
p.Gly455Val	D	U	10.48 <sup>b</sup>	—	—	—	—
p.Pro477Arg	D	U	3.31 <sup>a</sup>	—	—	—	—
<b>p.Gly494Val</b>	<b>S</b>	<b>U</b>	<b>-1.85</b>	<b>p.Gly494Ser</b>	<b>D</b>	<b>U</b>	<b>2.05</b>
p.Pro550Arg	D	U	5.15	—	—	—	—
p.Asn618Ile	D	U	2.35	p.Asn618Asp p.Asn618Ser	D S	F U	0.85 -0.28
p.Ala1701Val	S	F	-3.38 <sup>c</sup>	p.Ala1701Asp	D	U	5.87
p.Phe1743Leu	S	U	-0.04 <sup>c</sup>	p.Phe1743Leu	S	U	-0.04
p.His2082Asp	D	U	2.70 <sup>b</sup>	—	—	—	—
p.Gln2087Pro	D	U	8.29 <sup>b</sup>	—	—	—	—
p.Met2124Val	S	U	-0.60 <sup>a</sup>	—	—	—	—
p.Pro2153Leu	S	U	-0.64	p.Pro2153Gln p.Pro2153Arg	D D	U U	5.26 0.62
<b>p.Asp2267Gly</b>	<b>S</b>	<b>U</b>	<b>-0.99</b>	—	—	—	—
p.Ile2317Phe	D	U	2.06	—	—	—	—

<sup>a</sup> Values for  $\Delta\Delta G$  refer to stability against denaturant-induced unfolding.

<sup>b</sup> The mutant is predicted as one of the three most deleterious changes at this position.

<sup>c</sup> Predicted to be the less deleterious mutation.



**Supplemental Table 2: Structural impact of mutated residues on topological equivalent positions of homologous structures.** The stability of hypothetical point mutants of bovine FVai and human ceruloplasmin (PDB codes 1SDD and 1KCW, respectively) corresponding to the novel FVIII missense mutations identified in this work was assessed with CUPSAT. For residues of the FV-A2 domain, the corresponding values for topologically equivalent residues in A1 and A3 domains are given. Mutations are classified as fold-stabilizing (S) or destabilizing (D), and the torsion angles as favorable (F) or unfavorable (U). Unless otherwise indicated, values for  $\Delta\Delta G$  apply to thermal stability of the mutant protein, as compared to wild-type. Acc., solvent accessibility.

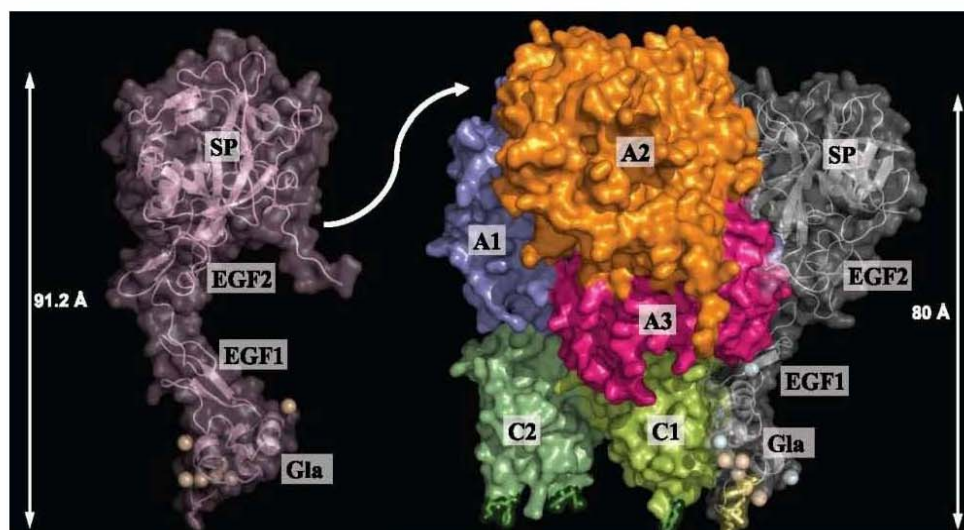
FVIII	1SDD	Acc. (%)	Overall effect	Torsion	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	1KCW	Acc. (%)	Overall effect	Torsion	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
<b>34</b>	<b>P50</b>	<b>55.7</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>0.16</b>	<b>E66</b>	<b>100.7</b>	<b>S</b>	<b>U</b>	<b>-2.22</b>
167	D153	2.1	D	F	0.52	D165	2.1	D	F	1.49
176	L162	0.0	D	U	12.0 <sup>b</sup>	L174	0.0	D	U	1.52 <sup>a</sup>
235	N207	0.0	D	U	4.16	N244	0.0	D	F	2.33
242	M214	5.5	D	U	7.63 <sup>b</sup>	L251	3.8	D	F	2.29
261	S233	8.5	D	U	6.88 <sup>b</sup>	G270	14.0	S	U	-1.04
<b>375</b>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
455	A64	0.0	D	U	5.22 <sup>b</sup>	A436	0.0	D	U	7.13 <sup>b</sup>
	A1609	0.0	D	U	4.29					
477	A86	0.0	D	U	6.11	P458	2.1	D	U	3.29 <sup>a,b</sup>
	A1631	5.4	D	U	0.23 <sup>a</sup>					
<b>494</b>	—	—	—	—	—	<b>R481<sup>c</sup></b>	—	—	—	—
550	P161	0.0	D	U	9.17	P537	0.0	D	U	5.21
	P1706	0.0	D	F	3.04					
518	N207	0.0	S	U	-0.95	N605	0.0	D	U	2.81
	N1768	0.0	D	U	3.16					
1701	A1548	0.0	D	F	0.11	A718	0.0	S	F	-4.32 <sup>c</sup>
1743	F1587	7.0	D	U	2.05	F773	4.0	D	U	2.98
2082	T1933	0.0	D	F	5.60	—	—	—	—	—
2087	Q1938	3.4	D	U	7.54	—	—	—	—	—
2124	M1975	15.5	S	F	-3.07	—	—	—	—	—
2153	P2004	0.0	S	U	-1.87	—	—	—	—	—
<b>2267</b>	<b>Q2119</b>	<b>99.1</b>	<b>D</b>	<b>U</b>	<b>2.26</b>	—	—	—	—	—
317	I2171	0.0	D	U	3.69	—	—	—	—	—

<sup>a</sup> Values for  $\Delta\Delta G$  refer to stability against denaturant-induced unfolding.

<sup>b</sup> The mutant is predicted as one of the three most deleterious changes at this position.

<sup>c</sup> Predicted to be the less deleterious mutation at this position.

<sup>d</sup> Flexibly disordered in the crystal structure. (Coordinates not included in the PDB entry).



### Supplemental Figure 1: Hypothetical structure of intrinsic Xase complex.

The most likely conformation of the FVIIIa•FIXa (Xase) complex predicted by ZDOCK is shown. The cofactor is represented as a solid surface with domains color-coded as in Figures 1B and 5, and the cognate serine protease is shown as a transparent gray surface superimposed on a cartoon of the model. The approaching substrate, FX, is represented to the left as a transparent light pink surface superimposed on a cartoon of the model. All protein domains are labeled.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions bound to the Gla domains of FIXa / FX are shown as wheat- and white/blue-colored spheres, respectively. Notice that multiple protein-protein contacts are formed between the concave “hemophilic surface” on FIXa (Brandstetter et al<sup>26</sup>) and cofactor domains A2, A3 and C1. The distances between serine protease and Gla domains of FIXa and FX are

indicated as distances between  $C\alpha$  atoms of Leu6 and the catalytic Ser365(195) and between those of Phe4 and Ser379(195), respectively. Notice that they are similar to the ones between FVIIIa-a1 and the phospholipid membrane in the compact cofactor model (compare Figure 5). A detailed description of model generation and analysis will be presented elsewhere (Corral-Rodríguez et al, in preparation).

### **3. VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS EN CASOS ESPECIALES CON HEMOFILIA A.**

Este apartado hace referencia a los resultados obtenidos en la aplicación de nuevas técnicas para el estudio de casos especiales con hemofilia A. De este trabajo de investigación han surgido los siguientes artículos.



RAPID IDENTIFICATION OF FEMALE HAEMOPHILIA A CARRIERS WITH DELETIONS IN  
THE FACTOR VIII GENE BY QUANTITATIVE REAL-TIME PCR ANALYSIS

*Thromb Haemost*

2005 Sep; 94(3):661-4

Tizzano EF, Barceló MJ, Baena M, Cornet M, Venceslá A, Mateo J, Foncuberta J, Baiget M

Síntesis del estudio:

En el presente estudio se demostró que el uso de la PCR cuantitativa a tiempo real, es útil para distinguir entre una y dos copias del gen *F8*. Se pudo establecer el número de copias en dos familias independientes, en una de ellas con una delección completa del exón 14 y donde 7 de los marcadores eran no informativos y la otra, con una delección que comprendía el exón 23 y 24.





## New Technologies and Diagnostic Tools

# Rapid identification of female haemophilia A carriers with deletions in the factor VIII gene by quantitative Real-Time PCR analysis

Eduardo F. Tizzano, María J. Barceló, Manel Baena, Mónica Cornet, Adoración Venceslá, José Mateo, Jordi Fontcuberta, Montserrat Baiget

### Summary

Large deletions of the factor VIII gene account for approximately 5% of severe haemophilia A patients. Although deletions are readily detectable in males, the identification of heterozygosity in possible carriers of these families still constitutes a challenge. In order to identify a deleted allele over the background of the normal allele in these carriers, we developed a rapid real-time quantitative PCR approach by means of LightCycler technology and SYBR green I for monitoring product formation. The

method was applied to families with independent deletions (one in exon 14 and the other in exons 23–24) of the Factor VIII gene, thereby allowing a reliable determination of carrier or non-carrier status. The method is extremely versatile and can be adapted to other deletions within the factor VIII gene as well as to other diseases whose molecular pathology consists of deletions or duplications.

### Keywords

Haemophilia A, carrier detection, deletions, factor VIII gene, Real-Time PCR, quantitative analysis

*Thromb Haemost* 2005; 94: 661–4

### Introduction

Patients with haemophilia A have a bleeding disorder caused by a deficient function of the coagulation factor VIII. The identification of carriers of the disease is an essential part of genetic counselling and prenatal diagnosis. The present approach to carrier diagnosis of HA depends on the type of mutation involved in the family. Large rearrangements frequently occur within the factor VIII gene in severe haemophiliacs. These include inversion of intron 22, which accounts for approximately 45% of severe patients (1); inversion of intron 1, a recurrent event although ten times less frequent than intron 22 inversion (2); and large deletions accounting for approximately 5% of severe patients. The remaining mutations are heterogeneous and are widespread within the factor VIII (FVIII) gene (3).

Carriers of the common intron inversions have a combined pattern of normal and altered bands and can be detected even when the index case is unavailable. However, although large deletions have readily been detected in males, they still constitute a challenge in females. Carriers of large deletions are mostly determined by marker analysis. Nevertheless, a proportion of isolated cases corresponds to new mutations, and the mother of an isolated case has an 85% chance of being a carrier (4). Thus, in such cases, marker analysis allows only carrier exclusion. An-

other disadvantage with this approach is when DNA markers are uninformative or when clue members are unavailable for testing.

We present two families with an isolated case of severe HA with a gross deletion in the factor VIII gene (patient 1 in exon 14 and patient 2 in exon 23–24). To resolve the carrier dilemma in these families we used a quantitative real time PCR method based on LightCycler technology. The application of this protocol allowed us to perform an accurate carrier diagnosis in both families. The assay is rapid, simple and robust and therefore well suited to carrier diagnosis in cases of HA with deletions.

### Patients and methods

#### Patients

Eleven individuals belonging to the two families were studied and a total of 20 controls (10 males and 10 females) were used to determine the functional sensitivity of the quantitative method.

#### Genotyping studies

DNA was isolated from peripheral blood samples using the salt-in-out method (5). The haplotype was obtained from several markers previously described (4, 6).

To characterise the mutation in the haemophiliacs, the coding regions and exon-intron boundaries were amplified according to

Correspondence to:

Eduardo F. Tizzano, M.D., Ph.D.  
Genetics, Hospital de Sant Pau  
Padre Claret 167  
08025, Barcelona, Spain  
Tel.: +34-93-291 9361, Fax: +34-93-291 9494  
E-mail: etizzano@hsp.santpau.es

Received March 1, 2005

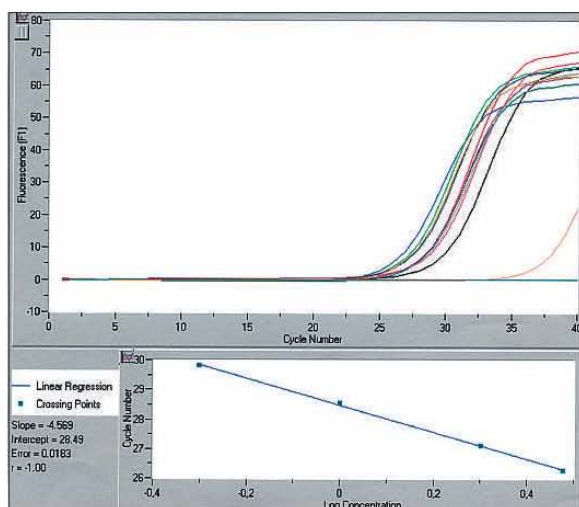
Accepted after resubmission May 12, 2005

Financial support:

This work was supported by Fundació Catalana d'Hemofília.

Prepublished online July 13, 2005 DOI: 10.1160/TH05-03-0144





**Figure 1:** Upper part: graphic representation of SYBR Green I fluorescence versus cycle number resulting from amplification of genomic DNA from individuals of family 1. Lower part: Regression curve of a healthy woman with two factor VIII gene copies. We used 1.5  $\mu$ l genomic DNA in concentrations of 1.25, 2.5, 5 and 7.5 ng/ $\mu$ l, respectively, corresponding to 0.5, 1, 2 and 3 fictive copies of factor VIII. The plot was used to calculate the reference curve represented by cycle number vs. log of the known concentration.

David et al. (7) with minor modifications in the reaction conditions. The amplified fragments were then purified with a QIAquick column PCR purification kit (QIAGEN), and analysed by direct forward and reverse sequencing using a DNA sequencing kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems) on an ABI PRISM 3100 Avant DNA automatic sequencer.

#### Quantitative analysis

To discriminate between one or two copies of a specific fragment of the factor VIII gene, DNA was diluted first to 20 ng/ $\mu$ l and then to a final concentration of 5 ng/ $\mu$ l. Exact measurement of the DNA concentration is the most important prerequisite for reliable determination of the gene copy number (8). The quantification was performed on the LightCycler Instrument (Roche Diagnostics) using the fluorescence resonance energy transfer

**Table 1:** Average values  $\pm$  SD of exon 14 (test) and exon 23 (reference) copy number in individuals of family 1. The ratio for the mother and the sister was close to 0.5 compatible with one copy of the exon 14 and two for exon 23. The ratio in the aunt was close to 1, confirming her as a non-carrier. As expected, the healthy father showed values corresponding to one copy of exon 14 and one of exon 23.

Individual	Exon 14	Exon 23	Ratio Ex14/Ex23
Father	1.03 $\pm$ 0.01	0.88 $\pm$ 0.03	1.17
Mother (carrier)	1.05 $\pm$ 0.07	2.05 $\pm$ 0.07	0.51
Aunt (non carrier)	1.8 $\pm$ 0.11	1.97 $\pm$ 0.02	0.91
Sister (carrier)	0.97 $\pm$ 0.02	2 $\pm$ 0.08	0.48
Patient	0.03 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.04	0.03

technique. Online measurements of PCR products were based on the use of SYBR Green I. A partial fragment of the factor VIII exon 14 was amplified with the forward 14 Q-F TGA AGA TAT TTC AGC ATA CTT G primer and the reverse 14Q-R CTT GGC TAT TCA TTA AAC CTG primer giving a PCR product of 680 bp. The exon 23 was amplified with the forward 23Q-F GTCTTATGTAGATGTTGGATG primer and the reverse 23Q-R AGTCTCAGGATAACTAGAACA primer and a 350 bp PCR fragment was obtained. The PCR was performed in a total volume of 10  $\mu$ l, containing 7.5 ng genomic DNA, 10 pmol of each primer, 1  $\mu$ l of Roche Molecular Biochemicals Faststart DNA Kit SYBR Green I, 4 mM MgCl<sub>2</sub>. The PCR conditions, the quantification and melting programs for the exon 14 factor VIII were hot start 95°C for 10 min followed by 40 cycles with 95°C for 15s, 60°C for 5s, 72°C for 25s and a fluorescent detection step at 76°C for 1s. The setting for exon 23 factor VIII was identical to that of exon 14 with the exception of an annealing temperature of 58°C. During the entire program, we used a maximum temperature transition rate of 20°C/s. This quantification program was followed by a melting program to detect the melting points for every PCR product for each sample. The analysis was performed with the Second Derivative Maximum Method of the Light-Cycler Software (8). We used DNA external standards that carry two factor VIII copies. This is a DNA from a healthy woman with healthy sons who inherited either of the two X-chromosomes. This woman can be considered unambiguously a non-HA carrier possessing two non-deleted factor VIII copies. We used 1.5  $\mu$ l genomic DNA in concentrations of 1.25, 2.5, 5 and 7.5 ng/ $\mu$ l respectively, corresponding to 0.5, 1, 2 and 3 fictive copies of factor VIII. All standards were used to calculate the regression curve. Sample concentrations were inferred from the regression curve in each experiment (Fig. 1). All samples were measured twice by using independent DNA dilutions of 5 ng/ $\mu$ l. Furthermore, DNA was amplified with primers of either the non-deleted reference exon 23 or the potentially deleted test exon 14, and vice versa, in each family member to determine their ratios.

#### Results

Testing of 10 healthy males showed mean  $\pm$ SD values of 1.06  $\pm$  0.12 corresponding to 1 copy of the exon 14 and exon 23, whereas 10 non-HA carriers showed values of 2.11  $\pm$  0.18 corresponding to 2 copies of the exon 14 and exon 23.

The index case from family 1 showed no PCR product of fragments 14-1, 14.2, 14.3 or 14.4 whereas exon 13 and exon 15 fragments were present (7). This patient was diagnosed as having a gross deletion of the entire exon 14. The precise intronic endpoints of this deletion were not ascertained. Seven markers in the mother of the patient were uninformative and carrier diagnosis could not be excluded in the haemophilic's sister and his maternal aunt.

The patient from family 2 showed no PCR fragments of exons 23 and 24 whereas exons 22 and 25 were present. The precise intronic endpoints of this deletion were not ascertained. The X-chromosome bearing the mutation was identified in the mother. Three sisters were studied as possible carriers one of them was ruled out as a carrier by marker analysis.

For a precise diagnosis in the possible carriers of both families we developed a further quantitative examination to discriminate between one or two copies of fragments of exons 14 and 23–24, respectively. Figure 1 shows the development of the fluorescence signals with exon 14 primers and melting curves for the same primers. Under the conditions used, primer-dimer formation was negligible. A similar approach was used in family two (graphics not shown, available upon request).

Table 1 shows the mean  $\pm$ SD values of each of the family 1 members tested in two independent experiments when compared with the external standard curve. The father, the mother and the sister showed values corresponding to one copy of exon 14 of the factor VIII gene. The maternal aunt showed values corresponding to two copies. To validate and confirm all these values, the ratio between average values of test exon 14 and reference exon 23 was calculated (Table 1). In the light of these results, the mother and the sister were diagnosed as carriers, whereas the aunt was identified as a non-carrier.

Table 2 shows the values of family 2. In two independent experiments, the mother and two sisters showed the mean  $\pm$ SD values corresponding to one copy of exon 23 of the factor VIII gene. The remaining sister showed values corresponding to two copies of exon 23 and 14. Based on these results, the mother and two sisters were diagnosed as carriers, whereas the remaining sister was identified as a non-carrier, confirming the haplotype data.

In both families, no overlapping was detected between the values for exon 14 corresponding to one ( $n=5$ ;  $1.03\pm 0.07$ ), or two copies ( $n=5$ ;  $1.91\pm 0.07$ ) or between the values for exon 23 corresponding to one ( $n=6$ ;  $1.00\pm 0.08$ ), or two copies ( $n=4$ ;  $1.94\pm 0.03$ ) (data for each individual in Tables 1 and 2).

## Discussion

The aim of this work was to develop a reliable assay for direct detection of HA carriers of gross deletions encompassing one or more exons of the factor VIII gene. We employed a rapid real-time quantitative PCR approach by means of LightCycler technology and SYBR green I for monitoring product formation. With this method, the initial copy number of the target template is determined by analysing the cycle-to-cycle change in fluorescence signal as a result of the amplification of the template during PCR. The fewer cycles it takes to reach a detectable level of fluorescence, the greater the original copy number. We applied this analysis independently to two families with different exon deletions (14 and 23–24). The procedure was speedy (1.5 days) and cost-effective. However, the need for comparison with an external standard curve demands an exact calculation of the DNA concentration, which is essential to the application of the method. Moreover, only DNA samples extracted by the same procedure can be reliably compared with reference samples (8).

The method was validated in HA with the analysis of controls and members of the families investigated. The factor VIII gene copy number was correctly determined in the control groups because it was twice as high in females as in males without overlapping within the groups. In both families the method determined

**Table 2: Average values  $\pm$ SD of exon 23 (test) and exon 14 (reference) copy number in individuals of family 2.** In the mother and two sisters, the ratio between test exon 23 and reference exon 14 was close to 0.5, compatible with one copy of exon 23 and with two copies of exon 14. The non-carrier sister showed values close to 1, compatible with two copies of both exons.

Individual	Exon 23	Exon 14	Ratio Ex23/Ex14
Father	$1.1\pm 0.14$	$0.96\pm 0.02$	1.14
Mother (carrier)	$1.05\pm 0.07$	$1.90\pm 0.06$	0.55
Sister (non carrier)	$1.97\pm 0.04$	$1.99\pm 0.02$	0.98
Sister (carrier)	$1.02\pm 0.03$	$1.93\pm 0.02$	0.52
Sister (carrier)	$0.96\pm 0.05$	$1.94\pm 0.007$	0.49
Patient	$0.01\pm 0.007$	$1.15\pm 0.07$	0.008

the relative quantification of the carrier or the non carriers of the deletion. This was achieved by comparing the family samples with a range of serial dilutions of a confirmed non-carrier female DNA used as external standard. Furthermore, the ratios of test exon 14/reference exon 23 and test exon 23/reference exon 14 in both families allowed confirmation of the results (Tables 1 and 2).

Large deletions (more than 50bp) are not uncommon events in HA, occurring in approximately 5% of severe cases. More than 100 unrelated cases with gross deletions have been reported in HAMSTeRS (3) involving one or more exons along the factor VIII gene. In practice, carrier diagnosis in such cases has been resolved by gene-tracking of the X-chromosome bearing the factor VIII deletion by marker analysis. However, isolated cases, uninformative markers and unavailable clue family members constitute limitations to this approach. Using our method, once an exon deletion has been identified in a patient, a first quantitative assay can be adapted to determine the exon copy number by comparison with the external standard curve. A second quantitative assay can be performed by choosing a different combination of test and reference exons to confirm the results. In practice, any exon of the factor VIII gene can be adapted to this assay with the battery of primers available (3, 7). In patient 1, the primers were located in a part of exon 14, which was totally deleted. In patient 2, the reverse primer was located in the deleted intron 23 (between the deleted exon 23 and 24). The lack of selective amplification of the sequence containing primer 23QF demonstrated that this region was also deleted in the patient (data not shown).

A similar quantitative assay protocol has been successfully applied in our laboratory to discriminate between one or two SMN1 gene copies in spinal muscular atrophy carriers (8). Similar assays based on the same principle have been described to differentiate deletions or duplications in the dystrophin gene in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy carriers (9) or to diagnose carriers of a F9 gene deletion (10).

We demonstrated that the method is extremely versatile and can be adapted to other deletions of the factor VIII gene. Moreover, it can be extrapolated to the detection of duplications (11) within the factor VIII gene.

### References

1. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M et al. Factor VIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an International Consortium study. *Blood* 1995; 86: 2206–12.
2. Bagnall RD, Wassem N, Green P et al. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe haemophilia A. *Blood* 2002; 99: 168–74.
3. HAMSTeRS. <http://europium.csc.mrc.ac.uk>.
4. Peake LR., Lillicrap DP, Boulyjenkov V et al. Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 313–44.
5. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1989; 6: 1215.
6. Tizzano E, Venceslá A, Cornet M et al. Utility of a (GT)<sub>n</sub> dinucleotide repeat in intron 1 of the factor 8 gene for haemophilia a carrier diagnosis. *Haemophilia* 2005; 11: 142–4.
7. David D, Moreira I, Lalloz MRA et al. Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5: 257–64.
8. Cusco I, Barceló MJ, Baiget M et al. Implementation of SMA carrier testing in genetic laboratories: Comparison of two methods for quantifying the SMN1 gene. *Hum Mutat* 2002; 20: 452–9.
9. Joncourt F, Neuhaus B, Jostardt-Foegen K et al. Rapid identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative real-time PCR. *Hum Mutat* 2004; 23: 385–91.
10. Costa C, Jouannic JM, Stieltjes N et al. Quantitative Real-Time PCR Assay for rapid identification of deletion carriers in hemophilia. *Clin Chem* 2004; 50: 1269–7
11. Acquila M, Pasino M, Lanza T et al. Duplication of exon 13 causes one third of the cases of mild haemophilia A in Northern Italy. *Haematologica* 2004; 88: 758–9.

MARKER AND REAL-TIME QUANTITATIVE ANALYSES TO CONFIRM HEMOPHILIA B  
CARRIER DIAGNOSIS OF A COMPLETE DELETION OF THE F9 GENE

*HAEMATOLOGICA*

2007 Nov; 92(11):1583-4

Venceslá A, Barceló MJ, Baena M, Quintana M, Baiget M, Tizzano EF.

Síntesis del estudio:

En este artículo se estudio una familia cuyo afectado tenía una deleción completa del gen del *factor 9* junto con otros genes próximos a él. La aplicación de la técnica de la PCR cuantitativa a tiempo Real y el estudio indirecto con marcadores hizo posible el diagnóstico de portadoras en la madre y una de las hermanas del caso índice.





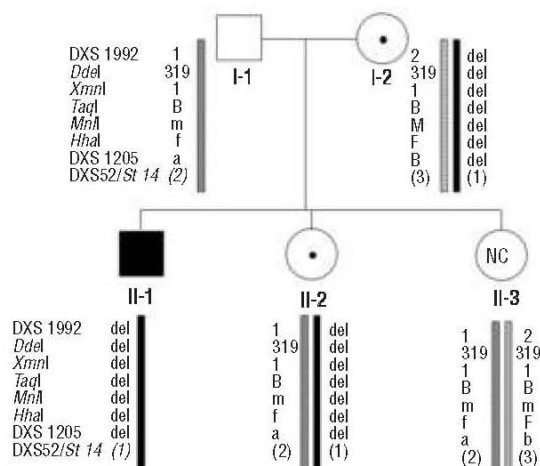
### Marker and real-time quantitative analyses to confirm hemophilia B carrier diagnosis of a complete deletion of the F9 gene

Approximately 3% of hemophilia B patients have major deletions in the F9 gene, half of which are complete. Marker and quantitative PCR analyses were employed for carrier diagnosis in a family of a mentally retarded hemophilia B patient with a total deletion of the F9 gene and neighbor genes. Both methodologies allowed the confirmation of carrier or non-carrier status.

*Haematologica* 2007; 92:11:

Large deletions (>50bp) occur in a minority of hemophilia B (HB) patients. From 2891 patients reported in the HB database to date ([www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html](http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemBdatabase.html)) 91 are major deletions and approximately half of these are deletions encompassing all the exons of the F9 gene. Deletions in a HB patient can be detected by lack of amplification of specific exons or by non-inheritance of marker alleles of the family. However, if a complete deletion of F9 gene is detected, the definition of hemizygous females constitutes a challenge.

We present an isolated case of severe HB with an approximately 2 Mb genomic deletion with complete loss of the F9 gene and neighbor genes. The pedigree of the family is shown in Figure 1. The patient is a 22-year old male with severe HB. He developed low-response permanent inhibitors. At 5 months he presented seizures and at age 4 he was diagnosed with autism. At present he is mentally handicapped. His mother and two sisters requested carrier diagnosis. The marker analysis<sup>1</sup> (Figure 1) revealed the absence of the corresponding bands in the probandus II-1 and apparently, homozygosity in the mother I-2. His sister II-2 only inherited the paternal haplotype without markers of maternal origin. The sister II-3 was heterozygous for different markers demonstrating the inheritance of the paternal and maternal haplotypes. In the patient, attempts to amplify the exons of the F9 gene<sup>2</sup> for sequencing purposes proved unsuccessful. However, the patient did amplify one of the *DXS52* alleles from the mother (Figure 1). In view of these results, the diagnosis of a big deletion encompassing the F9 gene was made. The employment of markers *DXS1192* (situated 1cM proximal) and *DXS1205* (situated 4.3 cM distal) flanking the F9 gene<sup>3</sup> yielded results identical to those of the intragenic markers, indicating that the deletion spanned beyond the F9 gene. It was assumed that the mother I-2 and the sister II-2 were most likely carriers of the whole deletion and that the sister II-3 was not a carrier. To confirm the foregoing, a further quantitative examination was performed. We designed an experiment to discriminate between one or two copies of exons 1 and 6 of the F9 gene employing a Real Time PCR. The exon 1 of the F9 gene was amplified by the forward 1-F GGGAGATGGACATTATTTCCC primer and the reverse 1-R GTGAAGAAGACAGCATCAGAT primer (262 bp). The exon 6 was amplified with the forward 6-F GCCAATGAGAAATATCAGG primer and the reverse 6-R CCAGTTTTGACACACCATC primer (279 bp). PCR was performed as previously described<sup>4</sup> with minor modifications (protocols available on request). We diluted to 7.5, 5, 2.5, and 1.25 ng/ $\mu$ L of DNA external standards that carry two F9 copies each dilution corresponding to 3,



**Figure 1.** Pedigree of the family reported. NC: non carrier. The haplotypes were obtained from several microsatellite markers: *Ddel* in intron 1; *XmnI* in intron 3; *TaqI* in intron 4; *MnlI* in exon 6 and *HhaI* at the 3' end of the gene1. To localize the end point of the deletion of the F9 gene we also used *DXS1192* and *DXS1205* flanking the F9 gene3. The *DXS52* locus (*St14* marker) adjacent to the factor F8 gene in Xq28 was employed to determine the segregation of the X chromosome in the family.

**Table 1.** Average values  $\pm$ SD of exon 1 and exon 6 copy number of F9 in individuals of family 1.

Individual	Exon 1	Exon 6	Ex 23 F8	Ratio F9/F8*
I-1 father	0.97 $\pm$ 0.02	0.94 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.06	0.92/0.89
I-2 mother	1.03 $\pm$ 0.03	0.97 $\pm$ 0.01	1.8 $\pm$ 0.05	0.57/0.53
II-1 patient	0.02 $\pm$ 0.007	0.01 $\pm$ 0.003	0.92 $\pm$ 0.02	0.02/0.01
II-2 sister	1.04 $\pm$ 0.09	1.03 $\pm$ 0.01	1.9 $\pm$ 0.06	0.54/0.54
II-3 sister	1.82 $\pm$ 0.02	1.78 $\pm$ 0.06	1.8 $\pm$ 0.05	1.01/0.98

\*The first value of the column corresponds to the ratio exon 1 F9/exon 23 F8 and the second to the ratio exon 6 F9/exon 23 F8. Testing of 10 healthy males with this method showed mean values of  $0.95 \pm 0.05$  corresponding to 1 copy of the exon 1 and 6, whereas 10 non-HB carriers showed values of  $1.81 \pm 0.107$  corresponding to 2 copies of the exon 1 and 6. The coefficient of validation (CV) of the assay was 5.91% for the female group and 5.26% for the male group.

2, 1, 0.5 fictive copies of F9. All standards were used to calculate the regression curve. Given that all exons of the F9 gene were deleted, we analysed exon 23 of the F8 gene4 as an external reference to determine the ratios of the deleted versus non-deleted gene (Table 1). Sample concentrations were inferred from the regression curve in each experiment. All samples were measured twice by using independent DNA dilutions of 5 ng/ $\mu$ L.

Carrier diagnosis of gross deletions involving one or more exons along the F9 gene has been resolved by marker analysis to track the X-chromosome bearing the F9 deletion. However, the occurrence of a complete deletion may constitute a limitation on this approach. Moreover, isolated cases, uninformative markers and unavailable clue family members may complicate the diagnostic scenario. Our patient lacked the 7 markers analysed whereas the mother was apparently homozygous for all of them. One of the sisters inherited only the paternal alleles and the other inherited both the paternal and maternal alleles. Therefore, marker analysis was

elpful to indicate that a complete deletion was present in the patient and that the mother and one of his sisters were carriers. The real time quantitative PCR approach by LightCycler methodology is a major tool to confirm carrier diagnostic situations<sup>4,5</sup> as in the family reported here. To study the complete deletion of the F9 in our patient, we designed two primer sets (exon 1 and 6) to determine the exon copy number for comparison with an external standard curve. Furthermore, we chose the exon 3 of the F8 gene as an external reference exon to corroborate the results. A second external reference of the X-chromosome, i.e. the dystrophin gene at the DMD locus<sup>6</sup> on Xp21 can be employed when F9 markers are uninformative. The method was validated in HB with the analysis of controls and members of the family under study.

Our patient has a deletion encompassing at least 2Mbp between F9 flanking markers DXS1192 and DXS1205. A number of genes such as MCF2 (a transforming gene member of a GDP-GTP exchange factors), CDR1 (cerebellar degeneration-related autoantigen 1) and SOX3 (a transcription factor involved in neural development) are included in this deleted region. The absence of one or more of these genes may justify the mental impairment observed in our patient. Interestingly, a male patient with HB and mental retardation with a 1.5Mbp deletion, which included the F9 and SOX3 genes, has been reported.<sup>7</sup> Furthermore, SOX3 has been involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency.<sup>8</sup> On the other hand, HB patients with a deletion of the transforming gene MCF2 and with no evidence of a neoplastic process or other clinical manifestations have been described.<sup>9,10</sup>

In conclusion, we performed an accurate HB carrier diagnosis in this family using traditional markers and a rapid, simple and robust quantitative Real Time assay. Other methods are warranted to overcome the carrier diagnosis of deletions. Moreover, genetic counselling in the HB carriers of this family should also consider the high-risk occurrence for autism-mental retardation in the descendants.

Adoración Venceslá,\* María Jesús Barceló,\* Manel Baena,\*  
Manuel Quimiana,<sup>o</sup> Montserrat Baiget,\* Eduardo F. Tizzano\*

\*Department of Genetics, Hospital de Sant Pau, Barcelona;  
<sup>o</sup>Haemophilia Unit, Hospital La Paz, Madrid, Spain

**Key words:** Haemophilia B, F9 gene, deletions, carrier detection, marker and quantitative analysis, real-time PCR.

**Correspondence:** Eduardo F. Tizzano, M.D., Ph.D. Genetics, Hospital de Sant Pau, Padre Claret 167, 08025, Barcelona, Spain. Fax: international +34.93.2919494. Phone: international 34.93.2919361. E-mail: etizzano@santpau.es

## References

1. Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briët E, Chan V, Ginter EK, et al. Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993;4:313-44.
2. Montejo JM, Magallón M, Tizzano E, Solera J. Identification of twenty-one new mutations in the FIX gene by SSCP analysis. *Hum Mutat* 1999;13:160-5.
3. Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996;380:152-4.
4. Tizzano EF, Barcelo MJ, Baena M, Cornet M, Venceslá A, Mateo J, et al. Rapid identification of female haemophilia A carriers with deletions in the factor VIII gene by quantitative real-time PCR analysis. *Thromb Haemost* 2005;94:661-4.
5. Costa C, Jouannic JM, Stieltjes N, Costa JM, Girodon E, Goossens M. Quantitative Real-Time PCR assay for rapid identification of deletion carriers in hemophilia. *Clin Chemistry* 2004;50:1269-70.
6. Joncourt F, Neuhaus B, Jostardt-Foegen K, Kleinle S, Steiner B, Gallati S. Rapid identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative real-time PCR. *Hum Mutat* 2004;23:385-91.
7. Rousseau F, Vincent A, Rivella S, Heitz D, Triboli C, Maestrini E, et al. Four chromosomal breakpoints and four new probes mark out a 10-cM region encompassing the fragile-X locus (FRAXA). *Am J Hum Genet* 1991 48:108-16.
8. Laumonnier F, Ronce N, Hamel CJ, Thomas P, Lespinasse J, Raynaud M, et al. Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. *Am J Hum Genet* 2002;71:1450-5.
9. Anson DS, Blake DJ, Winship PR, Birnbaum D, Brownlee GG. Nullisomic deletion of the mcf.2 transforming gene in two haemophilia B patients. *EMBO J* 1988;7:2795-9.
10. Katterling RP, Vielhaber EL, Lind TJ, Thorland EC, Sommer SS. The rates and patterns of deletions in the Human Factor IX Gene. *Am J Hum Genet* 1994;54:201-13.

SEVERE HAEMOPHILIA A IN A FEMALE RESULTING FROM AN INHERITED GROSS  
DELETION AND A DE NOVO CODON DELETION IN THE F8 GENE

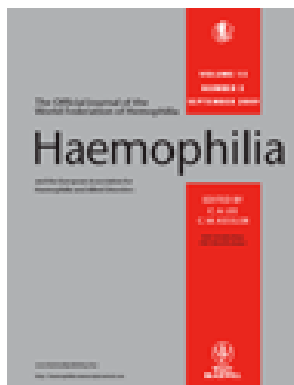
*HAEMOPHILIA*

2008 Sep; 14(5):1094-8.

Venceslá A, Fuentes-Prior P, Baena M, Quintana M, Baiget M and. Tizzano EF.

Síntesis del estudio:

En esta publicación se estudio una mujer con manifestaciones de HA grave aplicando tres metodologías diferente: (1) el análisis por marcadores, que nos confirmo que el caso índice había heredado un cromosoma de cada progenitor; (2) la secuenciación molecular que nos permitió detectar una de las mutaciones, consistente en la deleción de un codón en el exón 13 en la copia del gen *F8* procedente del padre y (3) el estudio cuantitativo del gen, que resolvió la condición de hemicigosis de la *probandus*, al ser portadora de una gran deleción (del exón 1 al 22) heredada de la madre.







ORIGINAL ARTICLE *Laboratory investigation*Severe haemophilia A in a female resulting from an inherited gross deletion and a *de novo* codon deletion in the *F8* gene

A. VENCESLÁ,\* P. FUENTES-PRIOR,† M. BAENA,\* M. QUINTANA,‡ M. BAIGET\* and E. F. TIZZANO\*

\*Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; †Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; and ‡Haemophilia Unit, Hospital La Paz, Madrid, Spain

**Summary.** Haemophilia A (HA) is an X-linked bleeding disorder caused by mutations in the *F8* gene. While the disease affects 1 in 5000 males, phenotypic expression of haemophilia A is rare in females, similar to other X-linked recessive disorders. We describe a 5-year-old female with severe haemophilia A. We determined the underlying molecular defect in the *F8* genes of the proband and her closest family members by direct DNA sequencing, marker analysis and quantitative real-time polymerase chain reaction. The patient showed two different mutations in the *F8* gene: the paternal copy of the *F8* gene had a *de novo* p.Phe652/653 deletion in exon 13

while the maternally inherited gene showed a large deletion encompassing exons 1 to 22. The structural analysis of residues Phe652/Phe653 based on a three-dimensional model of activated factor VIII provides evidence of the impact of the mutant factor VIII protein in the clinical manifestations of the patient. This unusual finding highlights the need to perform a thorough molecular analysis including sequencing, marker and quantitative analyses to identify compound heterozygous females with HA.

**Keywords:** deletion, female, *F8* gene, haemophilia A, quantitative PCR, structural analysis

**Introduction**

Haemophilia A (HA) is an X-linked bleeding disorder caused by mutations in the *F8* gene (*F8*) located in the long arm of X-chromosome (Xq28). The incidence of this disease is approximately 1 in 5000 males. Large rearrangements are common in the *F8* gene in severe haemophiliacs: the inversion of intron 22, which accounts for approximately 45% of the cases [1], the inversion of the intron 1 present in 2–5% [2] and large deletions or insertions found in approximately 5% of the patients [3]. The remaining mutations are heterogeneous and widely distributed in the *F8* gene.

HA is transmitted by female carriers who are usually asymptomatic given that they show normal or intermediate levels of factor VIII activity

(FVIII:C). However, in special circumstances a female may manifest haemophilia and may constitute the first case of the disease in a given family. These situations include: (i) two mutant *F8* genes that are either compound heterozygous or homozygous for a given mutation [4,5]; (ii) one mutant gene plus extreme X-chromosome inactivation [6]; (iii) numerical or structural abnormalities of the X-chromosome [7]; and (iv) one mutant gene plus an XY genotype manifesting as a female [8].

We present a family without history of bleeding disorders with a female manifesting severe HA and we describe the molecular pathology of the *F8* gene causing her disease.

**Patients, materials and methods***Case report*

A 5-year-old female is presented (II.1) (Fig. 1). She was diagnosed with severe HA at 7 months, after the appearance of a big haematoma in one of her arms following a venous puncture. She had undetectable levels of FVIII:C. Acquired haemophilia was

Correspondence: Eduardo F. Tizzano, MD., PhD, Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Ma. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.  
Tel.: 34-93-2919361; fax: 34-93-2919494;  
e-mail: etizzano@santpau.cat

Accepted after revision 23 June 2008

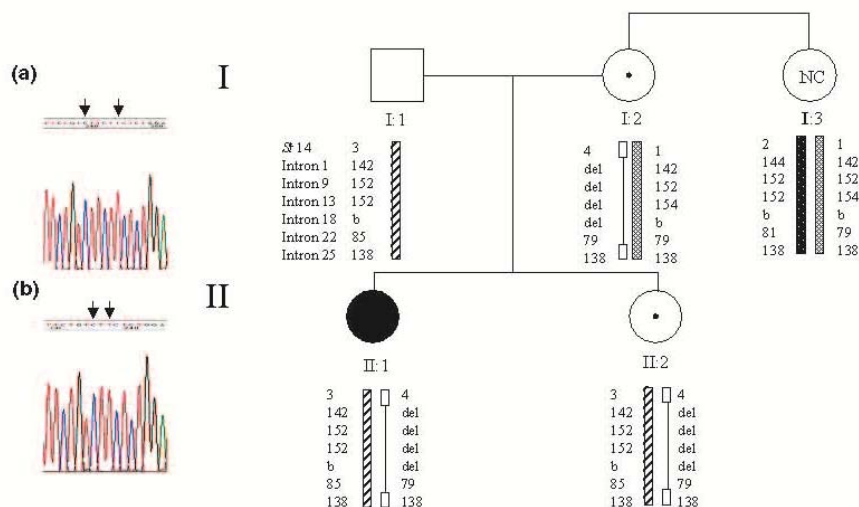


Fig. 1. Pedigree of the reported family. (a) normal sequence found in all individuals of the family except the proband; (b) sequence with the p.Phe652/653del mutation; NC, non-carrier. Arrows indicate the codon involved. Marker identification is showed at the left of individual I-1.

discarded given the absence of FVIII inhibitors. Because of repeated bleeding episodes, she has received prophylactic treatment with clotting factor since the age of 3 years.

#### Marker and sequencing analysis of the *F8* gene

DNA was isolated from peripheral blood samples using the salting-out method. Intron 22 and intron 1 inversion mutations were ruled out as reported earlier [9,10]. Haplotype results from the proband and her parents were obtained from several markers: extragenic DXS 52 (St 14) and intragenic intron 1 GT repeat, intron 9 TC repeat, intron 13 CA repeat, intron 22 CA repeat, intron 18 *BclI* and intron 25 GT repeat, as previously described [11]. All 26 exons and exon-intron boundaries of the *F8* gene were amplified using primers and polymerase chain reaction (PCR) conditions essentially as in David *et al.* [12] and as deposited in the HAMSTeRS database. The amplified fragments were then purified with a QIAquick column PCR purification kit (Qiagen, Izasa, Castellbisbal, Barcelona), and analysed by direct forward and reverse sequencing using a DNA sequencing kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Tres Cantos, Madrid, Spain) on an ABI PRISM 3100 Avant DNA automatic sequencer.

#### Quantitative real-time PCR of the *F8* gene

Exons 1 to 23 of the *F8* gene were amplified using primers described in David *et al.* [12] with the

exception of exon 13 that was analysed with primers 13F\_GTCTCCTCACATTGGGATTG and 13R\_CAGAGGAGAACTAGATCCC yielding a PCR product of 499 bp. PCR was performed as previously described [13] with minor modifications (protocols available upon request). We diluted external DNA standards that carry two *F8* copies to 7.5, 5, 2.5 and 1.25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ; these dilutions correspond to 3, 2, 1 and 0.5 fictive copies of *F8*, respectively. All standards were used to calculate regression curves. Sample concentrations were inferred from the regression curve in each experiment. All samples were measured twice by using independent DNA dilutions of 5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

#### Results

Marker analysis in the proband revealed heterozygosity only in the intron 22 repeat whereas the mother showed lack of heterozygosity for all intragenic markers tested (Fig. 1). DXS 52 (St 14) extragenic marker indicated that the proband inherited one X-chromosome from each parent. After sequencing all exons and exon-intron boundaries of the *F8* gene, a TTC deletion at nucleotide position 2016 in exon 13, corresponding to codon 652 or 653 was observed as a homozygous or hemizygous state (p. Phe652/653del, Fig. 1). This deletion predicts the absence of a phenylalanine in domain A2 of coagulation FVIII. The mutation was not detected in DNA extracted from peripheral blood of both parents.

1096 A. VENCESLÁ *et al.*

Table 1. Results of quantitative polymerase chain reaction analysis.

Family member	Exon 1	Exon 23	Ratio Ex1/Ex23
Father	1.02 ± 0.02	1.13 ± 0.07	0.89
Mother (carrier)	1.05 ± 0.07	2.24 ± 0.01	0.52
Aunt (non-carrier)	1.69 ± 0.06	1.99 ± 0.07	0.84
Sister (carrier)	0.93 ± 0.12	1.82 ± 0.16	0.51
Patient	1.19 ± 0.04	2.24 ± 0.11	0.52

Average values ± SD of copy numbers for *F8* exon 1 (test; similar figures were obtained for exons 2 to 22) and exon 23 (reference) in members of the studied family are given. Values in the mother, sister and patient were close to 1 with an exon 1/exon 23 ratio of around 0.5 compatible with the deletion of exon 1. This ratio in the aunt was close to 1, confirming her as a non-carrier. As expected, the healthy father showed values corresponding to one copy of each exon.

To differentiate between the homozygous and hemizygous states of the proband (i.e. to discriminate between one and two copies of different exons of the *F8* gene), we performed an experiment by real-time quantitative PCR using LightCycler technology and SYBR Green I staining [13]. Results for exons 1 to 22 were compatible with the presence of a single *F8* gene copy in the proband, her sister and in her mother (I-2), whereas two copies of exon 23 were detected in them (Table 1). We concluded that a large deletion encompassing at least exons 1 to 22 was present in this female haemophiliac. This finding was also consistent with the marker results (see before). In the light of these results, the patient was diagnosed with HA owing to a 3-bp deletion in exon 13 of the *F8* gene in the paternally derived X-chromosome, and a gross *F8* gene deletion inherited from her mother. Given that the patient had only one allele with exon 13, the sequence results were compatible with a hemizygous state of the mutation. This mutation was undetected in the peripheral blood DNA from the father and could therefore be the result of a *de novo* or a germinal mosaicism event. The sister of the proband (II-2) and their maternal aunt (I-3) were also studied. The sister

inherited the gross deletion from the mother but was not a carrier of the codon deletion. The aunt was discarded as carrier of the gross deletion by marker and quantitative analyses (Fig. 1 and Table 1).

## Discussion

Several cases of HA or haemophilia B (HB) in females have been reported because of mutations in homozygous or heterozygous states, mutations in one X-chromosome plus non-random X-chromosome inactivation and X-chromosome alterations. We describe a female with severe HA resulting from the coincidence of a *de novo* deletion of three base pairs, which predicts the absence of a phenylalanine in domain A2 of FVIII protein, and an inherited gross deletion of exons 1 to 22 in the second copy of the *F8* gene.

The concomitant occurrence of two mutations in a female with HA has been previously described in at least four cases (Table 2). Windsor *et al.* [14] reported a girl with severe HA, presenting a *de novo* FVIII inversion in her paternal chromosome and a *de novo* deletion in the long arm of the X-chromosome that includes the *F8* gene. Seeler *et al.* [15] described a girl that inherited an *F8* intron 22 inversion from her carrier mother and a *de novo* *F8* inversion from her father. The paternally derived X-chromosome from the patient had been preferentially inactivated in more than 95% of her somatic cells. A similar case of a female with two inversions was reported by David and co-workers [5]. These investigators found transcriptional inactivation of the maternal *F8* allele. Cai *et al.* [4] presented a patient with moderate HA due to a novel missense mutation inherited from her mother and a *de novo* frameshift mutation in the other X-chromosome. Furthermore, Costa *et al.* [16] described two sisters with HB, one of whom had severe HB and the other only a mild phenotype. Both girls inherited the same *F9* missense mutation from the mother who was a somatic mosaicism. In addition, in the patient with severe HB another mutation in the

Table 2. Summary of reported cases of females with haemophilia A because of two mutations in the *F8* gene.

Genotype				
Maternal allele	Paternal allele	Phenotype	Comments	Reference
Gross deletion ( <i>de novo</i> )	Intron 22 INV ( <i>de novo</i> )	Severe	First case in the family	Windsor <i>et al.</i> (1995)
Intron 22 INV (inherited)	Intron 22 INV ( <i>de novo</i> )	Severe	Paternally inherited X-chromosome inactivated	Seeler <i>et al.</i> (1999)
Intron 22 INV (inherited)	Intron 22 INV ( <i>de novo</i> )	Severe	Transcriptional inactivation of the maternal allele	David <i>et al.</i> (2003)
3637_3638insA ( <i>de novo</i> )	Leu1975Pro (inherited)	Moderate	Severe bleeding symptoms	Cai <i>et al.</i> (2006)
Gross deletion (inherited)	p.Phe652/653del ( <i>de novo</i> )	Severe	First case in the family	This work

other allele of the *F9* gene was detected, presumably inherited *de novo* from her father.

Usually, when detecting an X-linked gene mutation in females, one would expect to find the wild-type and the mutated sequence in a heterozygous state. In the present case, severe HA was present in a female patient without history of bleeding disorders in the family. We initially suspected that the HA in this girl was because of a mutation in one of the *F8* genes and extreme inactivation of the normal allele. However, the first finding to draw our attention was the detection in her peripheral blood DNA of a 3-bp deletion in exon 13 apparently in a homozygous or hemizygous state (Fig. 1). Moreover, the mutation was not present in the peripheral blood of her parents. Given that the patient was affected by severe HA, our second thought was that the girl had a chromosome alteration such as X-monosomy [7]. Another explanation to account for the possible homozygosity of the mutation was uniparental disomy [17]. However, the two alternatives were discarded by marker analysis of the Xq28 region, which revealed that the patient inherited the respective X-chromosomes with the *F8* locus from both parents.

To further analyse this family, we applied a real-time quantitative PCR approach by means of Light-Cycler methodology. The utility of this technique to solve carrier diagnosis in partial deletions of the *F8* gene has been previously demonstrated [13]. The complete quantitative analysis of all *F8* exons demonstrated that the mother and her daughter had a large deletion encompassing exons 1 to 22. The deletion breakpoint appears to be located at the end of exon 22 or the 5' region of intron 22, given that the patient was heterozygous for markers of the intron 22 CA repeat and homozygous for all the other polymorphisms investigated.

Carrier diagnosis was possible in this family by combining sequencing, quantitative and marker analyses. The mother and sister of the patient had the same gross gene deletion whereas her maternal aunt was diagnosed as a non-carrier. The p.Phe652/653 deletion was not present in the paternal chromosome inherited by the sister, suggesting that this mutation constitutes a *de novo* event or a germinal mosaicism. Genetic counselling in this family must mention that the patient runs a 100% risk of having HA sons or carrier daughters.

The p.Phe652/653 deletion has been reported previously in a male patient with severe HA and without inhibitors [18]. The severity of the disease in this previous case and in the current female haemophilic points to a significant structural impact of the

mutant FVIII protein. Indeed, inspection of our recently presented model of activated FVIII [19] reveals that none of the two consecutive phenylalanine residues Phe652/Phe653 is exposed in the mature cofactor. However, they occupy quite different positions in the three-dimensional structure. Phe653 is fully buried in the core of domain A2, where it engages in multiple van der Waals interactions with side chains of other aromatic (Trp637, Trp688) and aliphatic residues (Leu668, Leu690; see Fig. 2). In contrast, Phe652 is located close to the interface with domain A3, and contacts several neighbouring polar residues (e.g. Ser654, Thr667), but abuts in particular aromatic residues from domain A3 such as Tyr1786. Therefore, removal of any of these two Phe residues would have profound implications for the structure of domain A2. Two possible, not mutually exclusive functional outcomes of this deletion can be envisioned. First, mutant FVIII molecules are at least partially misfolded, and are intracellularly degraded. A second possibility is a rapid decay of FVIII procoagulant activity of mutant FVIII<sub>del652/653</sub> molecules that are properly folded and secreted, as the A2 domain in this variant

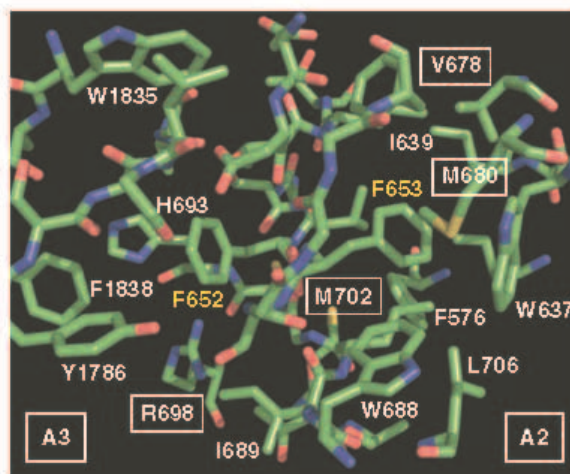


Fig. 2. Close-up around residues Phe652/Phe653 in the three-dimensional model of activated factor VIII. The view is along the  $\beta$ -strand that terminates in this pair of consecutive phenylalanine residues; this locates most residues from A2 and A3 domains to the right and left of the figure, respectively. For clarity, only residues that are within 6 Å of these residues are shown, and some side-chains have been omitted. Atoms are colour-coded according to atom type (green, carbon; red, oxygen; blue, nitrogen; yellow, sulphur). Notice that the Phe653 side chain is fully buried in the protein core, and engages in important interactions with several aromatic or aliphatic side-chains. In contrast, the phenyl ring of Phe652 faces the neighbouring A3 domain. Labels for residues affected by missense mutations reported in haemophilia A patients are boxed.

1098 A. VENCESLÁ *et al.*

would dissociate more easily from the A1/A3-C1-C2 heterodimer. In line with these hypotheses, the previously reported haemophiliac presented a large discrepancy between FVIII antigen and activity levels (12% and 1.4%, respectively) [18].

In conclusion, we determined the molecular pathology of both *F8* genes in a female with severe HA by the complementary use of direct DNA sequencing, marker analysis and quantitative real-time PCR. Our results highlight the need for a thorough molecular analysis to facilitate the molecular diagnosis of HA in females. These studies should include structural analysis to envisage the impact of the mutant FVIII protein, allowing an adequate follow-up and genetic counselling.

### Acknowledgements

This work was supported by Fundació Catalana d'Hemofilia and Real Fundación Victoria Eugenia.

### Disclosures

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

### References

- 1 Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M *et al.* Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995; **86**: 2206–12.
- 2 Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; **99**: 168–74.
- 3 Woods-Samuels P, Kazazian HH, Antonarakis SE. Non-homologous recombination in the human genome: deletions in the human factor VIII gene. *Genomics* 1991; **10**: 94–101.
- 4 Cai XH, Wang XF, Dai J *et al.* Female hemophilia A heterozygous for a *de novo* frameshift and a novel missense mutation of factor VIII. *J Thromb Haemost* 2006; **4**: 1969–74.
- 5 David D, Morais S, Ventura C, Campos M. Female haemophiliac homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles. *Haemophilia* 2003; **9**: 125–30.
- 6 Favier R, Lavergne J-M, Costa J-M *et al.* Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood* 2000; **96**: 4373–5.
- 7 Chuansumrit A, Sasanakul W, Goodeve A *et al.* Inversion of intron 22 of the factor VIII gene in a girl with severe hemophilia A and Turner's syndrome. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1379.
- 8 Loreth RM, El-Maarri O, Schröder J, Budde U, Herrmann FH, Oldenburg J. Haemophilia A in a female caused by coincidence of a Swyer syndrome and a missense mutation in factor VIII gene. *Thromb Haemost* 2006; **95**: 747–8.
- 9 Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem* 2005; **51**: 1154–8.
- 10 Tizzano EF, Cornet M, Baiget M. Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of hemophilia A. *Haematologica* 2003; **88**: 118–20.
- 11 Venceslá A, Baena M, Fares Taie L, Cornet M, Baiget M, Tizzano EF. Application of intron 9 and intron 25 dinucleotide repeats of the factor 8 gene to improve carrier diagnosis in haemophilia A. *Haemophilia* 2008; Apr 1; [Epub ahead of print].
- 12 David D, Moreira I, Lalloz MRA *et al.* Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; **5**: 257–64.
- 13 Tizzano EF, Barceló MJ, Baena M *et al.* Rapid identification of female haemophilia A carriers with deletions in the factor VIII gene by quantitative real-time PCR analysis. *Thromb Haemost* 2005; **94**: 661–4.
- 14 Windsor S, Lyng A, Taylor SA, Ewenstein BM, Neufeld EJ, Lillicrap D. Severe haemophilia A in a female resulting from two *de novo* factor VIII mutations. *Br J Haematol* 1995; **90**: 906–9.
- 15 Seeler, Vnencak J, Bassett, Gilbert, Michaelis. Severe haemophilia A in a female: a compound heterozygote with non-random X-inactivation. *Haemophilia* 1999; **5**: 445–9.
- 16 Costa J-M, Vidaud D, Laurendeau I *et al.* Somatic mosaicism and compound heterozygosity in female hemophilia B. *Blood* 2000; **96**: 1585–7.
- 17 Quan F, Janas J, Toth-Fejel S, Johnson DB, Wolford JK, Popovich BW. Uniparental disomy of the entire X chromosome in a female with Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 160–5.
- 18 McGinniss MJ, Kazazian HH, Hoyer LW, Bi L, Inaba H, Antonarakis SE. Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A. *Genomics* 1993; **15**: 392–8.
- 19 Venceslá A, Corral-Rodríguez MA, Baena M *et al.* Identification of 31 novel mutations in the *F8* gene in Spanish hemophilia A patients – structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites. *Blood* 2008; **111**: 3468–78.



APPLICATION OF MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)  
ANALYSIS TO UNMASK MOLECULAR PATHOLOGY OF THE F8 GENE IN ATIPICAL HA  
PATIENTS.

*Manuscrito en preparación*

Adoración Venceslá, Manel Baena, Rosario Pérez Garrido, Ramiro Núñez, Francisco  
Velasco, Jordi Rosell, Montserrat Baiget and Eduardo F. Tizzano.

Síntesis del estudio:

En este trabajo en preparación se resume el estudio de la patología molecular de 271 pacientes con HA. En particular, se describen cuatro pacientes que no presentaban ningún defecto en su gen *F8*, en los que se aplicó la técnica del MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) que determina la dosis génica de la totalidad de los exones del gen *F8*. En dos de esos pacientes se pudo resolver la mutación. Uno de los casos, es un paciente con HA grave y síndrome de Klinefelter (47,XXY) con una delección de los exones (1-12) en uno de sus genes *F8* y el otro caso, se trataba de un hemofílico grave con una duplicación de los exones 2-10. Los resultados obtenidos con MLPA fueron validados mediante la PCR cuantitativa a tiempo real (LightCycler).





**Application of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) analysis to unmask molecular pathology of the *F8* gene in atypical HA cases**

**Adoración Venceslá, Manel Baena, Rosario Pérez Garrido, Ramiro Núñez, Francisco Velasco, Jordi Rosell, Montserrat Baiget and Eduardo F. Tizzano.**

**Department of Genetics, Hospital de Sant Pau, Barcelona**

Reprint request and correspondence to:

Eduardo F. Tizzano, M.D., Ph.D. Genetics, Hospital de Sant Pau

Padre Claret 167, 08025, Barcelona, Spain. Fax: 34-93-2919494, tel: 34-93-2919361.

E-mail: [etizzano@santpau.es](mailto:etizzano@santpau.es)

**Key words: Haemophilia A, *F8* gene, mutation analysis, MLPA.**

This work was partially supported by the *Real Fundación Victoria Eugenia* and *Fundació Catalana d'Hemofilia*.

## Summary

Haemophilia A (HA) is an X-linked bleeding disorder characterised by a deficiency in the activity of factor VIII (FVIII). It is caused by a variety of mutations in one of the largest human genes, complicating molecular testing. We performed molecular analysis of 271 unrelated Spanish patients with haemophilia A. The results showed 115 patients (43.07%) with inversion of intron 22 and four (1.49%) with inversion of intron 1. For the remaining patients, we carried out direct sequencing of all PCR-amplified exon and exon-intron boundaries of the *F8* gene. Eleven haemophiliacs (4.11%) had large deletions (more than 50 bp) and 137 (50.55%) presented point mutations. Finally, no mutation in exons, exon-intron boundaries or promoter region of the *F8* gene was detected in four patients (1.47%) despite clinical and laboratory confirmation of HA. Two of these patients had severe HA and alterations in the *F8* gene were discovered using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification. One had Klinefelter Syndrome (47,XXY) and a large deletion masked by the other *F8* allele and the other showed a duplication spanning exons 2 to 10. The remaining two patients had mild HA and MLPA results were normal. The application of MLPA is useful to define HA patients in whom mutations are not detected with other routine methods. Nevertheless, in a small percentage of patients (less than 1%) no molecular pathology can be identified after testing several genetic methodologies.

## Introduction

Patients with haemophilia A have a bleeding disorder caused by a deficient function of the coagulation factor VIII. Several methodologies and strategies are available to detect the molecular defect in the *F8* gene of HA patients. Large rearrangements frequently occur within the *F8* gene in severe haemophiliacs. These include intron 22 and intron 1 inversions and large deletions, accounting all together for approximately 60% of severe patients. The remaining mutations are heterogeneous and are widespread within the *F8* gene [1] (and references therein). Once an inversion or a deletion is discarded in a patient, the complete sequence of the coding regions and exon–intron boundaries of the *F8* gene is usually attempted in selected laboratories. Even though all these screening methods are applied, in a minimum percentage of HA patients the molecular defect remains elusive [2].

In performing the molecular analysis in unrelated Spanish HA patients, we started with the inversion protocols followed by sequencing analysis, and detected four patients with clinical and laboratory diagnosis of HA but without mutations detectable by these techniques.

In this report we present the use of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) to discard quantitative molecular defects of the *F8* in those unusual cases [3]. Furthermore, we validated the employment of this methodology as a useful tool to be incorporated for routine molecular analysis of the *F8* gene in patients and carriers of the disease.

## Materials and methods

We analysed the *F8* gene in 271 unrelated patients with clinical and laboratory confirmation of HA. One hundred and ninety-three patients were classified as severe HA (FVIII:C less than 1%) and the remaining 78 were moderate-mild cases. Moreover, the patients were defined as familial or isolated according to the pedigree information available. After patients' gave informed consent DNA was isolated from peripheral blood samples using the salting-out method [4]. Screening for the intron 22 and intron 1 inversion was performed as previously described [5, 6]. Furthermore, an inverse PCR (I-PCR) method for detection of intron 22 inversion was validated in our samples following the protocol described by Rosetti *et al.* [7]. Our results in these previously genotyped samples agreed with those of Southern blot and marker analyses (data not shown). After exclusion of intron 22 and intron 1 inversions, all 26 exons of the *F8* gene were amplified including flanking exon-intron boundaries. Primer pairs and conditions were described elsewhere [1, 8]. In addition, 115 mothers of isolated HA patients were available for carrier diagnosis.

The SALSA P178 FVIII *probemix* kit, manufactured by MRC-Holland, is designed to amplify 45 regions. Thirty-three of these are located at *F8* locus on Xq28, 11 are distributed throughout the X-chromosome and one in chromosome 2 [9].

The MLPA® method is based on a multiplex PCR strategy. The different probes are designed with a complementary sequence to specific DNA sequence, a common sequence where the primers will be annealed to, and a stuffer sequence. This stuffer sequence is different for each probe so as to differentiate the PCR products by their size. Each pair of probes is separated by less than a nucleotide, and this separation is pasted by a ligase if the probes are fully complementary. Thus, the same pair of primers amplifies all fragments, and the PCR products have a length between 120-480 bp. To separate and quantify each PCR fragment we use the capillary electrophoresis on ABI Prism 3130 Avant Capillary DNA Sequencer. The GeneMapper software v4.0 package (Perkin Elmer- Applied Biosystems) was employed to interpret the obtained results.

Each peak is the result of the amplification product of a specific probe. Internal normalization to obtain the relative peak area (RPA) of each sample was achieved dividing the peak area

value of each *F8* probe with the combined peak areas of the control probes. We analysed peak area data to quantify the *F8* exon dosage. The values obtained were normalised with male and female control samples.

Positive results of the MLPA technique (deletion or duplications) were corroborated using a quantitative real-time PCR assay, into the LightCycler instrument (from Roche Diagnostics), based on a specific amplification of the corresponding exons of the *F8* gene as previously reported [10].

## Results

Of 271 patients with HA, 115 had inversion of intron 22 and 4 had inversion of intron 1. Of the remaining cases, 11 had large deletions (more than 50 pb) and 137 had subtle changes including missense, nonsense, frameshift and splicing mutations [11] (Table 1). When we stratified the patients into severe (n=193) or moderate-mild HA (n=78), the percentage of intron 22 inversions was 59.06% and that of intron 1 inversions was 2.07% within the group of severe patients. Large deletions included cases with exon 7, 10, 14, 15 and 23 alone, and others involving more than one exon such as 3-13, 7 and 8, 8-10, 15-17, 23 and 24, and 23-25.

Of the 137 point mutations, 91 were missense, 10 nonsense, 29 small deletions and insertions, and 7 splice site mutations. Exon 14 is the most commonly involved exon followed by exons 12, 11, 23, and 19. A total of 79 of the 137 mutations (57.66%) were detected in these exons. Fifteen were recurrent mutations present in 51 families. The p.R593C (exon 12) and p.R1997W (exon 19) were the most commonly found mutations in 11 and 7 unrelated patients, respectively. In contrast, 86 mutations were present only once in the remaining patients.

From the 115 mothers of isolated cases with a recognised mutation, the mutation was detected in 104 (90.43%). When this group was stratified in inversion (n=58) versus non-inversion (n=57) the proportion was 57/58 (98.27%) for the inversion group and 47/57 (82.45%) for the non-inversion group.

Finally, in four patients, despite their clinical and laboratory confirmation of HA, no mutation was detected in the coding region or in the promoter region of the *FVIII* gene.

**Patient 1.** A 22-year-old male with clinical symptoms of bleeding starting around one year. Because of puberty retardation, a chromosomal study at 12 years revealed a 47,XXY karyotype. He has three unaffected brothers. Marker analysis indicated that the patient had two identical maternal X-chromosomes, suggesting a non-disjunction in the 2<sup>nd</sup> meiotic

division. One of his non-affected brothers inherited the same single X-chromosome. MLPA analysis was compatible with a deletion of exons 1-12 in one of the *F8* alleles. The other allele appeared to be unaltered (Figure 1A). The mother showed two complete *F8* genes. The analysis of the (CAG) repeats in the first exon of the human androgen receptor gene (HUMARA) showed an identical number of repeats on each allele (data not shown). We assumed that this patient had a skewed X-chromosome inactivation of the normal *F8* allele with predominance of the deleted *F8* allele that would explain his severe manifestations. The identical marker information in both X-chromosomes precluded further analysis of X-inactivation.

**Patient 2.** This male was an isolated, severe HA case whose MLPA analysis showed a partial duplication involving exons 2-10 (Figure 1B). This duplication was detected in his mother and sister (data not shown) and predicts -assuming that it is arranged in tandem (head-to-tail mode)- a frameshift of the *F8* mRNA and protein sequence. In patients 1 and 2 the results were confirmed using the quantitative real time analysis (LightCycler) of the respective limiting exons.

**Patient 3.** This boy was an isolated mild HA proband (FVIII 18%) aged 6.

**Patient 4.** Was a mild hemophiliac grandfather aged 86 whose grandson was also affected with mild HA. The pedigree was compatible with X-linked inheritance.

In the last two patients (3 and 4) the MLPA results were normal and 2N von Willebrand disease and combined FVIII and FV deficit was also discarded

## Discussion

We analysed *F8* gene mutations in a cohort of 271 patients diagnosed with HA from different regions of Spain. The detection rate in our patients was 98.5% after screening of common inversions and gross deletions followed by sequencing analysis of negative probands. The percentage of severe patients with the common intron 22 inversion was 56.7%. This resembled findings from earlier reports (around 50% of the severe cases) [5]. In a proportion of patients with inversion we validated a recently published I-PCR method for detection of intron 22 inversion [7]. The method requires an overnight step for ligation after *BclI* treatment and standard PCR analysis, the products of which are easily distinguishable (487 and 559 bp). The results were consistent with previous methods such as Southern-blot analysis, which requires more steps and is time consuming [12], and with Long Distance PCR (rapid but sensitive to DNA quality, cycling, reagents and interpretation of bands) [13;14]. We conclude that I-PCR is a useful, rapid and reliable method of detection for the common intron 22 inversion. Despite the fact that this method does not allow discrimination of the type of inversion (distal, proximal) [14], this can be subsequently determined by a modification of the

previous method [15]. The frequency of intron 1 inversions and large deletions was roughly similar to those in other populations [16, 17].

The percentage of patients with subtle mutations was around 50.5%. The majority (66.42%) were missense mutations followed by 21.16% of small deletions and insertions, 7.29% of non-sense mutations and 5.1% splicing mutations. Until 2007, and similar to our results, about 47.74% of mutations reported in the HAMSTeRS database were missense, 22.68% were small deletions and insertions, 10.72% were non-sense, and 7.78% were splicing mutations.

Finally, in four of our patients, after exclusion of large rearrangements (intron 22, intron 1 and large deletions) the complete sequence of the coding regions, flanking introns and promoter analysis failed to detect any change in the DNA. Moreover, these cases were confirmed by clinical and laboratory findings as HA. This result was similar to findings in other studies where no genetic event in the coding region of the *F8* gene was identified. The percentages of HA patients without mutation in these studies ranged from 2- 5% [2, 18].

To further study our four atypical cases, we employed and validated the MLPA technique which was useful to identify the molecular pathology in two of them. The first patient was a Klinefelter syndrome affected by severe HA. There are several interesting aspects related to this case: the two X-chromosomes in this patient were the same and both were inherited from the mother as confirmed by marker analysis. This was compatible with a non-disjunction in the second meiotic division. The deletion detected by MLPA was present only in one of the *F8* alleles, indicating that it is a *de novo* event. Finally, this patient's phenotype was severe suggesting a skewed inactivation of the normal X to justify the clinical manifestations. This mechanism has been described in symptomatic carriers of HA [19]. The study of the pattern of inactivation of the X chromosomes could be approached by analysis of the androgen receptor (AR) locus and the use of restriction enzymes sensitive to methylation status. However, the CAG repeats in the first exon of the AR gene in this patient were identical, precluding further differentiation of the two chromosomes.

The second patient was a severe HA whose MLPA results showed a duplication encompassing exons 2-10. Three copies of the involved exons were detected in his mother and sister and, as a consequence, were defined as carriers of the duplication. These results confirmed the accuracy of the method to discover this type of molecular alteration. A duplication in exon 13 of the *F8* gene had been originally described by Aquila et al. in Italian moderate HA patients [20], and more recently Rost et al. [3] found that duplications may be present in around 0.5% of HA cases. In particular, this alteration should be expected when a patient with severe or moderate HA is negative for all the previous battery of molecular tests to determine the *F8* mutations. The severe phenotype of the patient may be justified by the

predicted frameshift of this large duplication. In both patients, the MLPA results were validated by using a quantitative method to perform dosage analysis of the *F8* gene exons that have been previously developed in our laboratory [10].

Finally, the molecular pathology in two mild HA cases remains unresolved. This situation \* could have been the result of cryptic splicing due to intronic mutations, low frequency somatic mosaicism [21], or lack of mRNA [22]. In these patients, the genetic abnormality may also be located outside the analysed regions of the *F8* gene, or in modifier genes that are important for the processing of FVIII expression and/or activity. In this respect, 2N von Willebrand disease (VWD) and a combined deficiency of FV and FVIII was initially discarded. VWD is caused by mutations in the *VW* gene in chromosome 12 and appears as a coagulation disorder due to qualitative and quantitative deficiency of vWF. This is one of the most common causes of diagnostic confusion with mild HA [23]. A failure in transportation of FV and FVIII from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus may occur when mutations in *ERGIC-53* and *MCFD2FVIII* are present, accounting for a combined deficiency of both factors [24]. In some of these cases, mRNA studies could be useful to detect splicing defects or gene rearrangements that are not detected by exon amplification and sequencing. However, one interesting study in 11 HA patients did not find abnormal splicing or rearrangements of the FVIII cDNA [25]. Further investigations including RNA studies should be necessary to unravel the molecular defect in our patients.

## Conclusion

We employed and validated MLPA analysis as a useful and effective technique to discover dosage molecular defects (deletions and duplications) in patients with HA. Given its versatility to analyse the whole gene in a few steps, this methodology should be incorporated into routine diagnosis after the screening of the most common inversions and prior to individual sequencing of all 26 exons of the *F8* gene.



**Table****Table 1.** Distribution of the mutations detected in unrelated HA patients. \* One patient had Klinefelter syndrome (47,XXY) and a large deletion in one of his X-chromosomes (see text).

<i><b>Mutation type</b></i>	<i><b>Nº of patients</b></i>	<i><b>Frequency (%)</b></i>
Intron 22 inversion	115	42.43
Intron 1 inversion	4	1.47
Large deletions (>50pb)	12*	4.42
Missense	91	33.57 %
Nonsense	10	3.69
Small deletions/insertions	29	10.70
Splicing	7	2.58
Duplications	1	.36
No mutation	2	.73
<b>Total</b>	<b>271</b>	<b>100</b>

**Figure Legends**

Graph showing the normalised values of exons of the F8 gene after MLPA analysis. Exons are numbered from left to right in sequential order. A) Patient 1 showing the deletion encompassing exon 1 to 12 in one of the F8 genes. B) Patient 2 showing the duplication of exon 2 to 10.

Figures

Figure 1.A

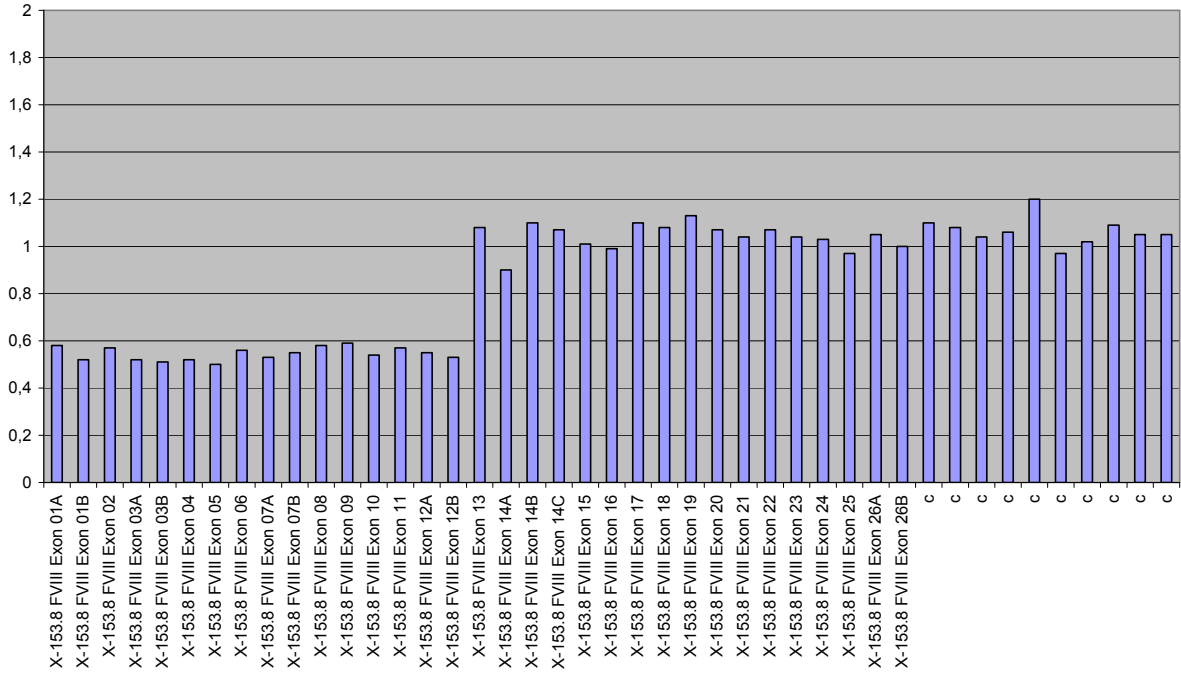
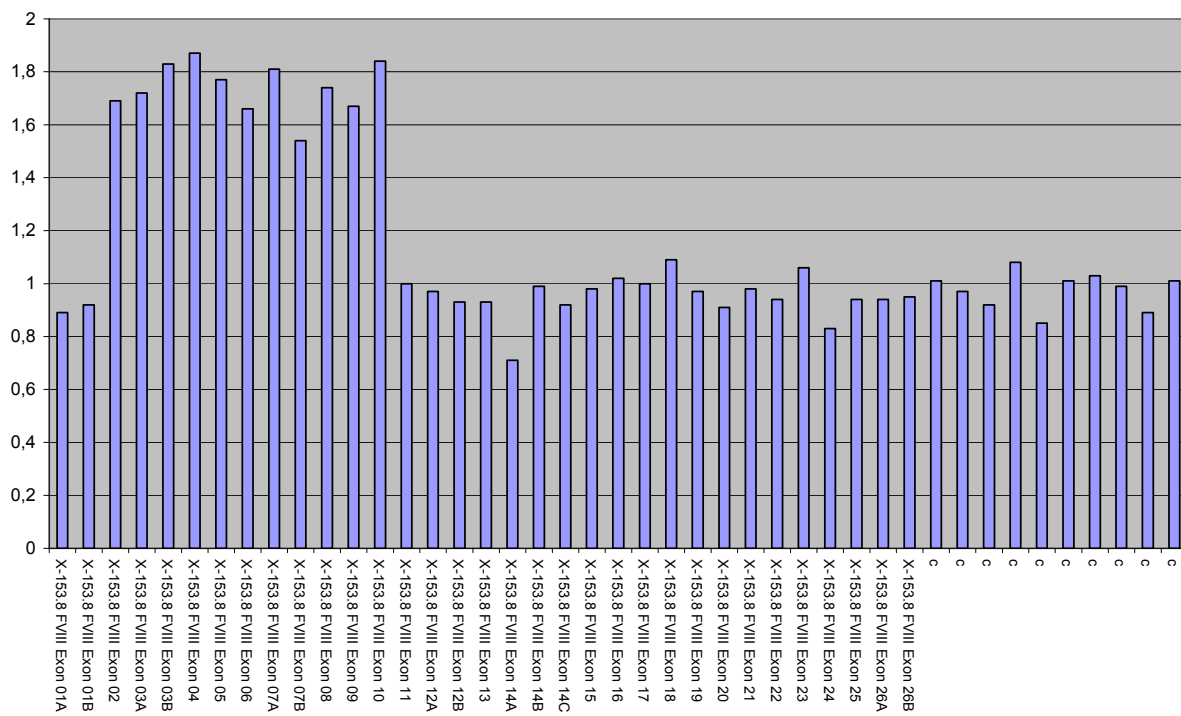


Figure 1.B



**References:**

1. <http://europium.csc.mrc.ac.uk/>
2. Klopp N, Oldenburg J, Uen C, Schneppenheim R, Graw J. "11 hemophilia A patients without mutations in the factor VIII encoding gene". *Thromb Haemost.* 2002 Aug; 88(2):357-60.
3. Rost S, Löffler S, Pavlova A, Müller CR, Oldenburg J. "Detection of large duplications within the factor VIII gene by MLPA". *J Thromb Haemost.* 2008 Nov;6(11):1996-9.
4. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells". *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
5. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, et al. "Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study". *Blood.* 1995 Sep 15; 86(6):2206-12.
6. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. "Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A". *Blood.* 2002 Jan 1;99(1):168-74.
7. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. "Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR". *Clin Chem.* 2005 Jul; 51(7):1154-8.
8. David D, Moreira I, Lalloz MR et al. "Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism". *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994 Apr; 5 (2):257-64.
9. <http://www.mrc-holland.com/>
10. Tizzano EF, Barceló MJ, Baena M, et al. "Rapid identification of female haemophilia A carriers with deletions in the factor VIII gene by quantitative real-time PCR analysis". *Thromb Haemost.* 2005 Sep; 94(3):661-4.

11. Venceslá A, Corral-Rodríguez MA, Baena M, *et al.* "Identification of 31 novel mutations in the F8 gene in Spanish hemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites". *Blood*. 2008 Apr 1; 111(7):3468-78.
12. Tizzano EF, Domènech M, Baiget M. "Inversion of intron 22 in isolated cases of severe hemophilia A". *Thromb Haemost*. 1995 Jan;73(1):6-9.
13. Liu Q, Sommer SS. "Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene". *Biotechniques*. 1998 Dec;25(6):1022-8.
14. Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. "Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection". *J Thromb Haemost*. 2006 Mar;4(3):591-8.
15. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. "Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene". *J Thromb Haemost*. 2008 May; 6(5):830-6.
16. David D, Ventura C, Moreira I, Diniz MJ, Antunes M, Tavares A, Araújo F, Morais S, Campos M, Lavinha J, Kembell-Cook G. "The spectrum of mutations and molecular pathogenesis of hemophilia A in 181 Portuguese patients". *Haematologica*. 2006 Jun; 91(6):840-3.
17. Vinciguerra C, Zawadzki C, Dargaud Y, Pernod G, Berger C, Nougier C, Négrier C. "Characterisation of 96 mutations in 128 unrelated severe haemophilia A patients from France. Description of 62 novel mutations". *Thromb Haemost*. 2006 Apr; 95(4):593-9.
18. Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M, Srivastava A. "Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions". *Haemophilia*. 2005 Sep; 11(5):481-91.

19. Bennett CM, Boye E, Neufeld EJ. "Female monozygotic twins discordant for hemophilia A due to nonrandom X-chromosome inactivation". *Am J Hematol*. 2008 Oct; 83(10):778-80.
20. Aquila M, Pasino M, Lanza T, Molinari AC, Rosano C, Bicocchi MP. "Exon skipping partially restores factor VIII coagulant activity in patients with mild hemophilia A with exon 13 duplication". *Haematologica*. 2005 Jul; 90(7):997-9.
21. 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 Jul; 69(1):75-87.
22. El-Maarri O, Singer H, Klein C, Watzka M, Herbiniaux U, Brackmann HH, Schröder J, Graw J, Müller CR, Schramm W, Schwaab R, Haaf T, Hanfland P, Oldenburg J. "Lack of F8 mRNA: a novel mechanism leading to hemophilia A". *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2759-65.
23. Mazurier C, Parquet-Gernez A, Gaucher C, Lavergne JM, Goudemand J. Factor VIII deficiency not induced by FVIII gene mutation in a female first cousin of two brothers with haemophilia A. *Br J Haematol*. 2002 Nov;119(2):390-2.
24. Spreafico M, Peyvandi F. "Combined Factor V and Factor VIII Deficiency". *Semin Thromb Hemost*. 2009 Jun; 35(4):390-9.
25. El-Maarri O, Herbiniaux U, Graw J, Schröder J, Terzic A, Watzka M, Brackmann HH, Schramm W, Hanfland P, Schwaab R, Müller CR, Oldenburg J. "Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene". *J Thromb Haemost*. 2005 Feb; 3(2):332-9.

## **VII. DISCUSIÓN GENERAL**



La presente tesis doctoral ha dado lugar a siete publicaciones. La discusión detallada de los resultados de este trabajo de tesis se incluye en cada uno de los apartados de discusión de dichas publicaciones que se presentan en la sección de resultados.

En la realización de este trabajo han participado 597 individuos entre: pacientes, mujeres portadoras obligadas o en estudio, familiares como padres y hermanos y por último, mujeres y hombres sin patología hemofílica, no relacionados entre sí, procedentes de toda la geografía española que han servido como control de la población general. En la parte introductoria de esta tesis se ha dejado constancia de la importancia del FVIII en la proceso de la coagulación, dado que cualquier cambio en su secuencia conlleva a alteraciones en la estructura de la proteína más o menos dramático que interfiere en la relación con los otros componentes de la coagulación. Estos cambios, además están asociados a distintos grados de manifestación clínica de la enfermedad con un tratamiento diferente para cada uno de ellos. El conocer la patología molecular de un paciente con HA y el diagnóstico de portadoras en riesgo de la familia son de fundamental importancia para lograr un adecuado asesoramiento genético.

Por lo mencionado anteriormente y con el fin de conocer más sobre la patofisiología de la enfermedad y realizar diagnósticos moleculares más completos, este trabajo de tesis ha basado sus investigaciones en los siguientes puntos básicos:

1. Identificar nuevos marcadores polimórficos en el gen *F8* de la coagulación.
2. Caracterizar la patología molecular en pacientes con HA.
3. Validación y aplicación de nuevas técnicas de estudio molecular en casos especiales con hemofilia A.

## **1. Identificación de nuevos marcadores en el gen *F8* de la coagulación.**

Uno de los problemas que se puede encontrar en el estudio molecular de la HA es la falta de informatividad por falta de heterocigosidad de los marcadores en una familia en concreto y por lo tanto, la imposibilidad de distinguir el alelo portador del que no lo es. Por eso, cuanto mayor sea el número de marcadores que se utilicen y estos presenten una mayor tasa de heterocigosidad, las posibilidades de que sean informativos en las familias aumentan. Los primeros marcadores utilizados en el estudio indirecto en nuestro laboratorio fueron el marcador extrágénico St-14 y como marcadores intragénicos los RFLP localizados en el intrón 18 (Peake *et al*, 1993) y en el intrón 22 (Chan *et al*, 1989) y los dinucleótidos situados en los intrones 13 y 22 (Lalloz *et al* 1991; 1994). Pero a pesar de su uso, una serie de



familias seguían siendo no informativas para esos cuatro marcadores intragénicos, lo que hacía necesario el estudio de otros nuevos. La informatividad de los marcadores polimórficos se ha comprobado que no es la misma según la población que se esté estudiando es decir, un mismo marcador puede presentar mayor heterocigosidad en unos grupos étnicos que en otros (Lin *et al*, 2000; de Carvalho *et al*, 2007). La informatividad en un número alto de familias españolas no había sido investigada y en este trabajo de tesis se decidió ampliar la batería de marcadores estudiando inicialmente un marcador dinucleótido situado en el intrón 1 y posteriormente los localizados en el intrón 9 y 25 (ver sección de resultados de esta tesis pág. 81 y 87). Una nueva técnica por PCR fluorescente permitía obtener resultados rápidos y fiables. Los distintos números de repeticiones encontrados para cada dinucleótido fueron diferentes y la heterocigosidad observada se ajustaba bastante con la esperada en los tres casos (Tabla 6)

Microsatélites	Alelos (nº de repeticiones)	Frecuencias	H <sub>E</sub>	H <sub>O</sub>
Intrón 1 (GT <sub>n</sub> )	15	0.014	0.56	0.42
	16	0.62		
	17	0.22		
	18	0.07		
	19	0.057		
	20	0.014		
Intrón 9 (TC <sub>n</sub> )	14	0.84	0.28	0.28
	15	0.11		
	16	0.04		
	17	0.01		
Intrón 25 (GT <sub>n</sub> )	16	0.032	0.41	0.38
	18	0.75		
	19	0.09		
	20	0.10		
	21	0.015		

**Tabla 6. Frecuencias alélicas** para cada uno de los microsatélites obtenidas de: 282 cromosomas para el caso del intrón 1 y de 200 cromosomas en el caso del intrón 9 y 25 de la población general española. H<sub>E</sub>= Heterocigosidad esperada; H<sub>O</sub>= Heterocigosidad obtenida

El marcador del intrón 1 y el del 9 habían sido descritos previamente en un resumen por (Dardik *et al*, 2002). Estos autores habían encontrado tres alelos para el dinucleótido del intrón 1 (GT)<sub>n</sub> desde 14 a 16 repeticiones. Sin embargo, en nuestra población dicho marcador era más polimórfico llegando a diferenciarse hasta seis alelos. El estudio del intrón 1 en el trabajo de tesis permitió detectar el alelo patológico en el 40% de mujeres que estaban en estudio, por no ser informativas para ninguno de los cuatro marcadores intragénicos utilizados hasta el momento *Xba*I (intrón 22), *Bcl*I (intrón 18) y los dinucleótidos (CA/TG) situados en los intrones 13 y 22. El hecho de resolverse parcialmente el porcentaje de mujeres informativas en las familias con hemofilia A en estudio, marcó el interés para seguir buscando marcadores que pudieran caracterizar el alelo portador de la mutación y resolver el mayor número posible de casos. La incorporación de los dinucleótidos (TC/GA)<sub>n</sub> del intrón 9 y el (GT/AC)<sub>n</sub> del intrón 25 permitieron pasar de una informatividad acumulada del 87 al 91% en nuestro laboratorio. El marcador del intrón 25 había sido descrito previamente por Kim *et al*, 2005, aunque los autores habían localizado de forma errónea a dicho marcador en el intrón 24. La diferencia principal que se encontró con respecto a la

población coreana estudiada por el grupo de Kim, fue que el número de repeticiones y por lo tanto la heterocigosidad era más elevada que en nuestra población. Ellos investigaron 500 mujeres y el número de repeticiones del dinucleótido iba desde 15 hasta 22 y un solo caso fue encontrado con 9 repeticiones y otro con 23. La mayor frecuencia la presentó el alelo con 18 repeticiones, el mismo que en nuestra población. Recientemente se ha publicado que en el intrón 25 existe otro marcador polimórfico (Machado *et al*, 2009) lo que aumenta el número de marcadores intragénicos disponibles a 9 (Tabla 7).

Marcador	Ubicación (intrón)	Heterocigosidad (%)	Referencia
(GT/AC) <sub>n</sub>	Intrón 1	42%	*Este trabajo de tesis
(CA/TG) <sub>n</sub>	Intrón 6	4.39%	Lin <i>et al</i> , 2000
(TC/GA) <sub>n</sub>	Intrón 9	28%	*Este trabajo de tesis
(CA/TG) <sub>n</sub>	Intrón 13	91%	Lalloz <i>et al</i> , 1991
<i>BclI</i>	Intrón 18	-	Peake <i>et al</i> , 1993
<i>XbaI</i> (B)	Intrón 22	18%	Chan <i>et al</i> , 1989
<i>XbaI</i> (C)		30%	
(CA/TG) <sub>n</sub>	Intrón 22	45%	Lalloz <i>et al</i> , 1994
(GT/AC) <sub>n</sub>	Intrón 25	35%	Kim <i>et al</i> , 2005 (mal ubicado)
		38%	*Este trabajo de tesis
(TG/CA) <sub>n</sub>	Intrón 25	52%	Machado <i>et al</i> , 2009

**Tabla 7. Marcadores intragénicos para el estudio indirecto del F8.** (\*) = descrito en este trabajo de tesis; (-) = dato no disponible.

El uso de marcadores polimórficos en la rutina del laboratorio para la determinación del alelo patológico y el seguimiento de segregación de este en la familia es una herramienta complementaria para establecer el estatus de portadoras. Sin embargo, en algunas circunstancias se vuelve imprescindible. Por ejemplo, en muchos laboratorios por cuestiones económicas, el estudio indirecto es la única herramienta asequible para hacer un diagnóstico molecular. A esto, hay que sumarle que no en todos los casos es posible resolver el defecto molecular causante de la enfermedad, bien porque no hay un hemofílico disponible para el análisis en la familia o porque no se encuentra la mutación (Klopp *et al*, 2002). En otros casos, el análisis mutacional por sí solo es difícil de interpretar para dar un diagnóstico de portadoras (ver sección de resultados pág. 123 y 129). De ahí la importancia de hacer un estudio conjunto y complementario con marcadores polimórficos y el estudio mutacional. Por último, en familias afectadas de hemofilia cada vez son más frecuentes las consultas para diagnósticos genéticos preimplantatorios. Para éstos, la necesidad de conocer el haplotipo del alelo portador del defecto molecular es imprescindible, dado que la puesta a punto de los estudios directos (inversión, delección, mutaciones puntuales) es más

complicada a partir de una célula embrionaria. La aplicación de cebadores marcados con un fluorocromo hace que el producto de PCR pueda visualizarse adecuadamente, de forma rápida y fiable, aún a partir de muy poco material.

## **2. Identificación y caracterización de la patología molecular en pacientes con HA.**

De los 267 pacientes con patología molecular, 195 fueron clasificados con hemofilia grave, mientras que el resto presentaban un fenotipo moderado o leve, además, los pacientes fueron definidos como casos familiares o aislados en función de la información obtenida en la genealogía.

Las frecuencias por tipo de mutación en nuestra población estudiada fue la siguiente: 130 fueron del tipo inversión del intrón 22, del intrón 1 y grandes deleciones (> 50 pb) que se correspondía con el (48.7%) del total de las mutaciones, de las 137 restantes, 91 fueron mutaciones *missense* (34%), 10 del tipo *nonsense* (3.74%), 29 pequeñas deleciones o duplicaciones (10.86%) y 7 se localizaron en la zona de *splicing* (2.62%) (Tabla 8).

<b>Tipo de mutación</b>	<b>Nº de individuos</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Inversión Intrón 22	115	43.07
Inversión Intrón 1	4	1.49
Grandes deleciones (>50pb)	11	4.11
<i>Missense</i>	91	34.08 %
<i>Nonssense</i>	10	3.74
Pequeñas del/ins	29	10.86
Zona de <i>splicing</i>	7	2.62
<b>Total</b>	<b>267</b>	<b>100</b>

**Tabla 8. Frecuencias por tipo de mutación en nuestra población estudiada**

En nuestro laboratorio, las mutaciones encontradas están distribuidas por todos los exones del *F8* (Figura 15) con excepción de los exones 3, 5 y 21 donde no hemos encontrado hasta el momento ninguna. El exón donde la incidencia de cambios patológicos es mayor es el 14, hecho que cabría esperar por la razón de que es el que presenta un mayor tamaño (3106 pb) además de que contiene por un lado, dos zonas de repeticiones de adeninas que ocasionan casi el 25% de las pequeñas deleciones en el *F8* y por otro, las secuencias CpG.

En este caso, los residuos de metionina que se encuentran en el dinucleótido CpG están metiladas en el átomo de carbono 5. El residuo 5-metil-citosina puede deaminarse espontáneamente, dando lugar a un residuo de timidina, este cambio de nucleótido conlleva un cambio de aminoácido, por lo tanto, estas zonas ricas en islas CpG tienen una frecuencia alta de mutación. Aunque dicho desapareamiento es reconocido por una ADN glicosilasa específica que reemplaza la timina por una citosina, este proceso de reparación es lento e ineficaz. En total hay unas 70 secuencias CpG distribuidas en la zona codificante del *F8* y representan de un 30-40% de las mutaciones puntuales (Pattinson *et al*, 1990). Los nucleótidos se han numerado basándonos en la secuencia del GenBank NM\_000132.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) y las mutaciones se han descrito siguiendo la nomenclatura recomendada por Den Dunnen y Antonarakis, 2001. El porcentaje de mutaciones por exones se aproxima bastante a lo descrito en el HAMSTeRS

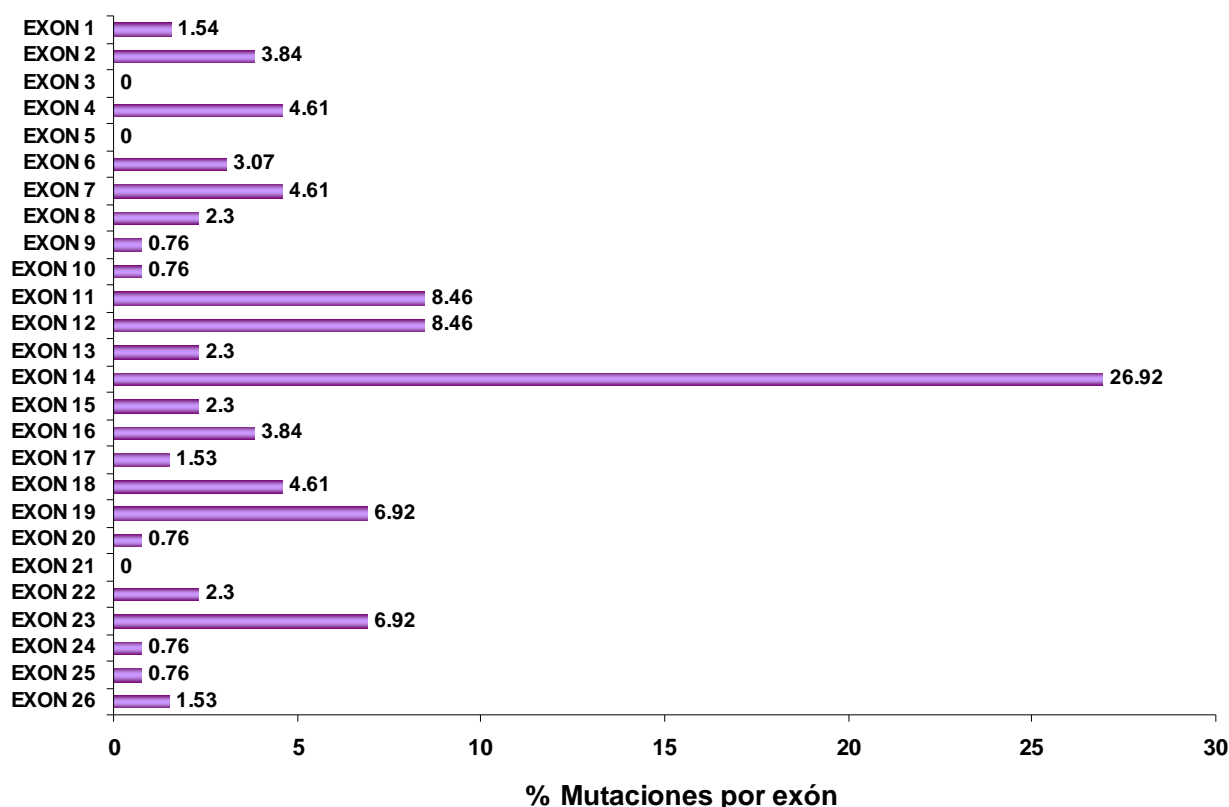
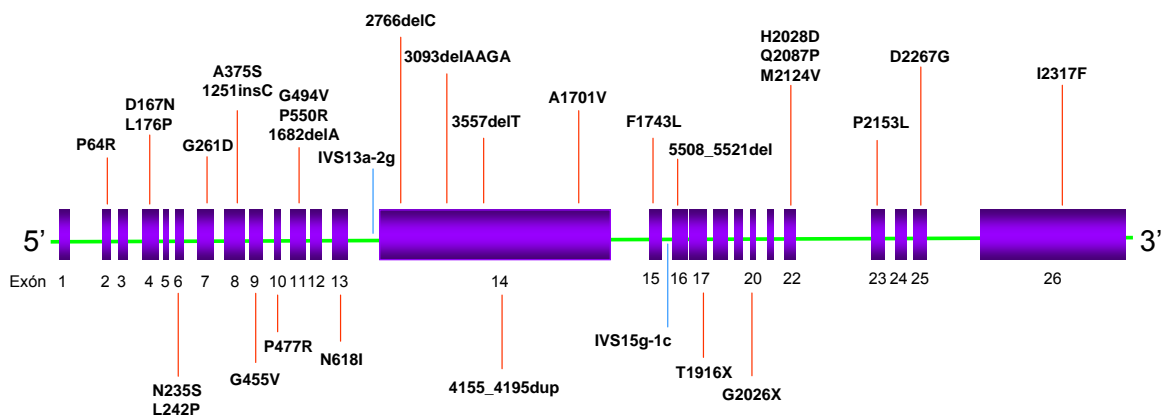


Figura 15. Espectro mutacional (en porcentaje) distribuido por exones, de las 130 mutaciones puntuales descritas en este trabajo de tesis (*missense*, *nonssense* y pequeñas *deleciones* e *inserciones*). Los cambios ocurridos en la zona de *splicing* no se han contemplado

De todos estos cambios detectados en nuestro laboratorio, 31 mutaciones se describen por primera vez en el gen *F8* de la población hemofílica (ver sección de resultados de esta tesis pág. 103) (figura 16), dos de las cuales eran de tipo *nonsense*, siete eran pequeñas inserciones o deleciones que alteraban la pauta de lectura, dando lugar a un codón stop *downstream* de la mutación, provocando de forma prematura el final de la transcripción de la proteína (David *et al*, 2003), dos se detectaron en la zona de *splicing* en la región aceptora de la secuencia consenso, lo que predice una alteración en el proceso de maduración del pre-mRNA, (El-Maarri *et al*, 2005; Gau *et al*, 2003). Al no disponer de RNA de dichos pacientes no pudimos comprobar los posibles efectos de ninguna de estas mutaciones. Sin embargo, las 11 alteraciones se asumieron como los causantes de la patología molecular que originaba la HA en los afectados. Esto fue debido a que los mecanismos de acción deletéreos de cada uno de ellos era evidente (proteína truncada, ausencia de exones) y a que todos los pacientes manifestaban un fenotipo grave, a excepción de uno de ellos con una deleción de una citosina en la posición 2766. Aunque la deleción predecía un codón stop cuatro aminoácidos después de la deleción, este paciente cursaba con una hemofilia moderada, una posible explicación podría ser, un error en el propio mecanismo de la transcripción que obviase de alguna forma, el codón stop prematuro y como consecuencia se obtuviese una proteína completa, aunque no totalmente funcional que justificaría el fenotipo moderado. En este grupo de pacientes, solo tres desarrollaron inhibidores (3/10, 30%, dado que en uno no había datos disponibles). Este porcentaje es similar al esperable para estos tipos de patología molecular (Goodeve y Peake, 2003). Por último, los 20 cambios restantes fueron cambios *missense*, los cuales se sometieron a un análisis para confirmar que eran las causantes de la patología hemofílica (ver apartado 2.4 de la sección de materiales y métodos de esta tesis).



**Figura 16. Representación esquemática en el gen *F8* de las 31 mutaciones nuevas.** Estas mutaciones han sido descritas por primera vez en población hemofílica en este trabajo de tesis. La nomenclatura utilizada es la recomendada por Den Dunenn y Antonarakis, 2001.

Basándonos en el análisis de un modelo de la estructura tridimensional del FVIIIa, y considerando la información clínica disponible para los pacientes estudiados, pudimos agrupar las mutaciones *missense* en dos tipos: las de **tipo I**, que son aquellas que provocan una deficiencia cuantitativa del FVIII, y las de **tipo II** o deficiencias cualitativas del cofactor. De forma general, el impacto de una mutación depende de su localización en la estructura 3D de la proteína y de las diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre el residuo de aminoácido que se encuentra en la proteína natural, y el que lo reemplaza en el mutante. Para realizar esta clasificación comparamos también, en los casos en que era posible, las nuevas mutaciones descubiertas con cambios previamente reportados que afectaban al mismo codón y/o a posiciones equivalentes en otros dominios del FVIII o de la ceruloplasmina.

La mayoría de las mutaciones encontradas pertenecen al primer grupo; de modo general, se trata de residuos altamente conservados y que se localizan en el núcleo hidrofóbico de la proteína. Además, estos residuos participan en múltiples interacciones, generalmente dentro del mismo dominio, y por lo tanto, su sustitución por otros residuos afecta en última instancia al plegamiento del cofactor. Esto da lugar a una proteína inestable que se secreta muy poco y/o que es rápidamente eliminada de la circulación. Así, siete de estas mutaciones *missense* fueron identificadas en individuos con HA grave, cinco en pacientes con hemofilia moderada, y ocho en casos leves de la enfermedad.

Por otra parte, cuatro de las 20 mutaciones *missense* corresponden al tipo II (p.Pro64Arg, p.Ala375Ser, p.Gly494Val, p.Asp2267Gly), ya que afectan a residuos expuestos en la superficie del cofactor y que se encuentran en regiones poco conservadas. Por lo tanto, es muy poco probable que cambios en estos residuos puedan influir negativamente sobre el plegamiento de la proteína, el cual, predecimos que se mantiene esencialmente inalterado en estos cuatro mutantes. Las mutaciones de tipo II afectan principalmente a la función del cofactor, al alterar sus interacciones con otras macromoléculas como el vWF o el FIXa. Ninguno de los pacientes con estas mutaciones *missense* consta que haya desarrollado anticuerpos (inhibidores), lo que también es esperable de acuerdo a la literatura (Goodeve y Peake, 2003).

El análisis estructural de las nuevas mutaciones *missense* identificadas en nuestro trabajo, permite profundizar en el conocimiento sobre las bases moleculares de la hemofilia A, al mejorar la comprensión de las consecuencias funcionales que tienen ciertas mutaciones sobre el FVIII. En particular, el estudio estructural sugiere nuevas áreas de contacto en la superficie del cofactor, que pueden resultar importantes para el mecanismo de activación del factor X por el complejo FVIIIa·FIXa.

Después de la realización de todos esos estudios el análisis de las mutaciones podría completarse con estudios funcionales *in vitro* que caracterizarían aún más el efecto molecular.

En nuestra casuística se ha estudiado una familia especial donde existían cuatro hemofílicos en distintas generaciones con distinto nivel de gravedad (uno grave y tres moderados). Si bien cabría pensar que en todos ellos la mutación era la misma, el dato de los fenotipos y la genealogía (uno de los hemofílicos tenía un abuelo materno aparentemente sano y su tío abuelo materno hemofílico) hacían sospechar que se debían investigar todos sus miembros y no solo el caso índice. Así fue como se determinó que los haplotipos en los moderados era diferente al del caso grave y el análisis mutacional confirmó que se trataban de dos mutaciones diferentes. Una de ellas, era de *novo* en el caso índice y predecía un comportamiento como hemofilia grave (p.K1439fsX3). La otra, estaba presente en los otros tres afectados (p.Arg1966Gln) y se había descrito en pacientes con fenotipo moderado. Este caso fue publicado (ver sección de resultados de esta tesis pág 97) como el primero en el que se describían dos mutaciones en hemofílicos de la misma familia. La conclusión de dicha publicación indica la importancia de: (1) disponer de toda la información fenotípica de los pacientes hemofílicos de una familia; (2) la obtención de una genealogía completa y (3) la complementariedad de los estudios indirectos con los mutacionales en todas las familias con más de un paciente hemofílico en distintas generaciones.

Finalmente como se describe en resultados (ver sección de resultados pág 141), de 115 madres disponibles de casos esporádicos, en 104 de ellas se determinó su estado de portadoras de la correspondiente mutación, por lo tanto, según los datos obtenidos de nuestro estudio, ante un caso esporádico de HA, la probabilidad de que la madre sea portadora es de 90.43% (104/115). Cuando se estratifica este grupo en inversiones (n=58) *versus* no inversiones (n=57), la proporción de madres portadoras de la mutación en casos esporádicos con inversión es de un 98.27% (57/58), siendo para las otras mutaciones del 82.45% (47/57). El resto se tratarían de casos de *novo* o mosaicismo germinal. En un trabajo previo de nuestro laboratorio realizado en las madres de casos con inversión que tenían más de un hijo afectado se excluyó la presencia de mosaicismo germinal (Tizzano *et al*, 2003).



### **3. Validación y aplicación de nuevas técnicas de estudio molecular en casos especiales con hemofilia A.**

Tradicionalmente la hemofilia es una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, donde las mujeres son portadoras asintomáticas y los varones presentan una clínica hemorrágica. Sin embargo, hay casos especiales de hemofilia en los que es necesario la aplicación de nuevas metodologías para definir la patología molecular. Por un lado, están los pacientes con diagnóstico clínico y pruebas de coagulación que indican HA pero en los que no se detecta la patología molecular después del análisis sistemático de inversiones, deleciones y secuenciación completa de los exones y las zonas de unión exón e intrón. Por otro lado, están las mujeres que manifiestan la enfermedad y las portadoras de una deleción o duplicación en el gen *F8*. En ambas situaciones, los estudios de dosis génica del *F8* pueden ser de gran utilidad.

#### **3.1 Pacientes sin mutación detectable**

En nuestra experiencia de 271 casos de hemofilia A estudiados para determinar su patología molecular, en 267 fue posible establecerla a partir de la metodología disponible. En cuatro casos (1,5%) los resultados fueron negativos. Este hecho, había sido descrito por otros autores anteriormente (Kloop *et al*, 2002; Guillet *et al*, 2006; Jayandharan *et al*, 2005). Dichos resultados no dejan de ser sorprendentes, dado que hasta hace poco, se consideraba que la causa de que una proteína estuviera alterada o no funcionara solo podía corresponder a una mutación en la secuencia del gen correspondiente.

De los cuatro casos, uno se trataba de un síndrome de Klinefelter (47,XXY) que presentaba una hemofilia grave y que por estudio de marcadores se determinó que ambos cromosomas X provenían de su madre. Asimismo se trataba del mismo cromosoma, lo que indicaba que había ocurrido una no-disyunción en la segunda división meiótica. Todos los estudios moleculares dieron normales y entonces se sometió la muestra al estudio de dosis génica por MLPA. Dicha técnica indicó que había una deleción parcial de los exones 1 al 12 del gen *F8* y que el otro alelo, era normal (ver sección de resultados pág. 141). La explicación más plausible de este caso es que se trate de una deleción de *novo* en uno de los genes *F8* y que hubiera una inactivación extrema fundamentalmente en hígado, del cromosoma portador del gen *F8* que no presenta la deleción, lo que explicaría la clínica de hemofilia en este paciente. Este mecanismo se ha descrito en algunos de los casos de mujeres portadoras con clínica de hemofilia (Bennett *et al*, 2008). En la mayoría de los estudios de

inactivación de X en mujeres, era posible diferenciar ambos cromosomas X (el paterno del materno). Sin embargo en este caso, el cromosoma X extra de este paciente era el mismo. El estudio del gen del receptor de andrógenos resultó con igual número de repeticiones CAG en ambos alelos por lo tanto, no era posible realizar estudios de inactivación del X con enzimas de restricción sensibles a la metilación. El otro paciente se trataba de una hemofilia A grave, sin ninguna alteración molecular detectada por estudio de inversiones y secuenciación directa del gen, sin embargo, el análisis de MLPA indicó una duplicación de los exones 2 al 10. Su madre y hermana eran portadoras de dicha duplicación. Las grandes duplicaciones (de un exón o más) dentro del gen *F8* han sido recientemente descritas como causa molecular de la hemofilia en un grupo de pacientes con HA cuya patología molecular no se había podido definir previamente (Acquila *et al.* 2008, Rost *et al.* 2008).

Por último, los otros dos casos se trataban de pacientes con HA leve esporádica (caso 3) y HA leve familiar (caso 4) (ver sección de resultados pág. 145) en los que el análisis de MLPA, a diferencia de los dos casos anteriores, no fue efectivo para determinar su alteración molecular. En estos pacientes, asumiendo que el diagnóstico es correcto, las posibles hipótesis para explicar su cuadro clínico serían:

(a) mutaciones en el propio gen *F8*:

(a1) alteraciones en zonas internas del intrón que regula de alguna manera el *splicing*, provocando la pérdida de exones que no detectamos en el análisis de ADN (generación de sitios críticos de *splicing*)

(a2) mosaicismo somático de baja frecuencia que hace que no se detecte la mutación del *F8* en el ADN que obtenemos de linfocitos de sangre periférica y que podría estar presente en hígado.

(b) Mutaciones en los elementos que regulan la expresión génica de *F8*,

(b1) Elementos que actúan en *cis*, como las regiones promotoras que determinan la posición y la eficacia de la transcripción. A este respecto, se ha descrito la ausencia de mRNA de *F8* estructuralmente normal como un nuevo mecanismo que ocasiona HA grave (El-Maarri *et al.*, 2006)

(b2) Elementos que actúan en *trans*, como podrían ser, los factores de la transcripción, estos son fundamentales para que se una la polimerasa y comience la transcripción.

(c) Mutaciones en genes que codifican proteínas relacionadas con el FVIII

(c1) Aquí se consideran las proteínas responsables del transporte del FVIII desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, ERGIC-53 y MCFD2, dado que mutaciones en ambas proteínas o en alguna de ellas provoca una deficiencia combinada de FV y FVIII (F5F8D). Normalmente este déficit va asociado a un fenotipo leve o moderado de tendencia de sangrado. La frecuencia de esta patología es extremadamente rara (1:1,000.000) en la población general (Spreafico y Peyvandi, 2009)

(c2) Proteínas que actúan en la modificación postraducciona del FVIII (Berdard *et al*, 2005).

En los pacientes tres y cuatro en ninguna de sus secuencias, incluyendo los promotores (Dai *et al*, 2009) de cada uno de ellos se hallaron cambios que justifiquen una alteración en el funcionamiento del gen y no se disponía de RNA para determinar si había fallos en la transcripción comprobando la presencia o no de mRNA del *F8*. De todas formas, es probable que un fallo en la transcripción predeciría una hemofilia grave, como la del caso publicado por El-Maarri *et al*, (2006). La dificultad es aún mayor si se tiene que cuantificar el grado de expresión del *F8* en RNA de sangre periférica por la imposibilidad de obtener RNA de hígado, que sería donde se expresa fundamentalmente. De esta forma, el disponer de RNA de estos pacientes podría ayudar a descartar alguna de estas hipótesis. (El-Maarri *et al*, 2005).

### **3.2 Mujeres portadoras de una deleción.**

En los pacientes con grandes deleciones (de uno o más exones completos) los marcadores polimórficos pueden ser de utilidad para el diagnóstico si están ausentes en el afectado. También pueden ayudar a diagnosticar si la madre o hermanas fueran o no portadoras de acuerdo a la informatividad de esos marcadores. Por ejemplo, en el paciente con la deleción completa del exón 14, no había informatividad en la madre y por lo tanto se necesitaba de una técnica que permitiera la dosificación de ese exón. En este trabajo de tesis se ha validado la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real para la HA y la HB. Por un lado, se describieron dos familias con HA, una ya comentada con deleción completa del exón 14 y otra con la deleción de los exones 23-24 (ver sección de resultados de esta tesis pág. 123). Además, se publicó el estudio de una familia con HB, cuyo afectado presentaba una deleción completa del gen *F9* y otros genes adyacentes (ver sección de resultados pág 129). El reto en ambos casos fue poder discriminar qué mujeres en la familia eran portadoras heterocigotas de la deleción. La técnica de PCR cualitativa no es de utilidad en estos casos,

ya que la presencia del alelo normal, enmascara la pérdida de una parte del gen. Fue a través del método de PCR cuantitativa a tiempo real que se pudo determinar la dosis génica de cada exón, definiendo cuales eran las portadoras en cada una de las familias. El trabajo de dosis génica del *F8* ha sido el primero en publicarse en la literatura. Con respecto al *F9*, Costa *et al*, (2004) habían descrito con menos detalle el diagnóstico de una mujer embarazada portadora de hemofilia B. Los dos trabajos de esta tesis demuestran que tanto el estudio indirecto por marcadores como el directo por dosis génica son complementarios para lograr un correcto diagnóstico molecular en estas portadoras.

### 3.3 Mujeres afectadas con hemofilia.

Existen casos excepcionales, donde por diversos mecanismos moleculares hay mujeres con expresión fenotípica de la enfermedad dentro de una familia, (ver apartado 2.6 de la introducción). En este trabajo de tesis se han estudiado tres familias sin antecedentes de varones con HA, cuyas mujeres presentaban clínica de la enfermedad (Tabla 7) (ver sección de resultados pág. 133 y anexos pág. 198). Ninguno de los casos correspondió al de una portadora con inactivación extrema del X sano (Bennet *et al*, 2008) sino a la presencia de mutaciones en homocigosis, heterocigosis compuesta y hemicigosis (tabla 7). La presencia de este tipo de mutaciones en los genes *F8* de mujeres afectadas ha sido previamente descrita por otros autores. (Windsor *et al*, 1995; David *et al*, 2003; Pavlova *et al*, 2009).

Familia	Paciente	Genotipo Patogénico		Cariotipo	Mecanismo Molecular	Clínica
		Alelo materno	Alelo paterno			
1	1.1	delección exones 1-22 (heredado)	p.Phe652/653del (de novo)	XX	Mutaciones diferentes afectando ambos alelos del <i>F8</i> .	Grave
2	2.1	p.Ser1791Pro (heredado)	p.Ser1791Pro (heredado)	XX	Homocigota para la mutación	Moderada
2	2.2	p.Ser1791Pro (heredado)	p.Ser1791Pro (heredado)	XX	Homocigota para la mutación	Moderada
2	2.3	p.Ser1791Pro (heredado)	p.Ser1791Pro (heredado)	XX	Homocigota para la mutación	Moderada
3	3.1	p.Phe2127Ser (heredado)	-	XY	Un gen <i>F8</i> mutado y genotipo XY	Leve/moderada
3	3.2	p.Phe2127Ser (heredado)	-	XY	Un gen <i>F8</i> mutado y genotipo XY	Leve/moderada

Tabla 9. Casos especiales de mujeres con clínica hemofílicas.

En el primer caso, se trataba de una paciente con HA grave sin inhibidor portadora de una delección del exón 1 al 22 heredada de su madre y una delección de tres pares de bases que predecían la ausencia del codón 652-653 que corresponde a fenilalanina (p.Phe652/653del), mutada de *novο* en el alelo paterno. El análisis de marcadores hacía sospechar la presencia de una posible delección (al no heredar alguno de los marcadores maternos) y fue confirmada y limitada gracias al estudio cuantitativo por PCR cuantitativa a tiempo real (LightCycler).

En los otros casos de mujeres afectadas, la secuenciación del gen fue suficiente para resolverlos. En la familia dos, ambos padres consanguíneos llevaban la misma mutación En (p.Ser1791Pro) que transmitieron a sus hijas. De particular interés es el caso de las dos hermanas afectadas por Síndrome de Morris (insensibilidad a los andrógenos) que son mujeres con dotación cromosómica XY. Ambas presentaban la mutación en el receptor de andrógenos (AR) (p.Arg855His) y, concomitantemente una mutación *missense* (p.Phe2127Ser) en el gen *F8* previamente no descrita en pacientes con HA. El análisis estructural de esta mutación predijo un efecto leve-moderado como el que presentan estas pacientes y ocurriría por alteración en el sitio de unión al factor von Willebrand, proteína transportadora del FVIII. Loreth *et al.* (2006) publicaron un caso similar, esta vez de síndrome de Swyer y hemofilia leve causada por una mutación *missense* (p.Pro2992His). El síndrome de Swyer ocurre también en mujeres con dotación cromosómica XY y se trata de un fallo en la diferenciación gonadal masculina por la alteración de otros genes distintos al AR.

### **3.4 Validación de los métodos de cuantificación de dosis génica para el estudio del *F8* y *F9*.**

Los métodos cuantitativos (es decir aquellos que pueden confirmar la presencia de una o varias copias de alguna zona o de la totalidad del gen) son una alternativa para encontrar delecciones o duplicaciones de los genes *F8* y *F9*. En este trabajo de tesis se han validado los métodos de PCR cuantitativa a tiempo real por LightCycler para el estudio cuantitativo de exones de manera individual (ver sección de resultados de esta tesis pág. 123 y 129). El MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) es una técnica de cuantificación génica, que permite detectar simultáneamente delecciones/duplicaciones totales o parciales, rearrreglos desconocidos e incluso mutaciones puntuales a partir de ADN genómico, agilizando el tiempo de diagnóstico. Con la puesta a punto del MLPA, el tiempo de resolución del diagnóstico puede reducirse, puesto que en un solo experimento es posible hacer un cribado completo del gen del individuo o de las portadoras en estudio. Está técnica

ha sido patentada por la empresa MRC Holland ([www.mrc-holland.org](http://www.mrc-holland.org)) y existen protocolos para el gen *F8* y *F9* como se describió en materiales y métodos (pág 69).

Recientemente se ha publicado un trabajo español donde se demuestra la utilidad del MLPA en casos de hemofilia B con delección del *F9* (Casaña *et al*, 2009)

Los objetivos alcanzados en este apartado son:

- 1) Estandarización de la técnica de PCR cuantitativa a tiempo Real y de MLPA en pacientes afectados con hemofilia A y portadoras de grandes delecciones en el gen *F8*.
- 2) Aplicación para el estudio de individuos con un diagnóstico clínico claro de HA, a los que no se había podido establecer su patología molecular en el gen *F8* con las técnicas en uso (como en el caso de los pacientes y portadoras con duplicaciones de exones completos).
- 3) Validación de la técnica MLPA con la de PCR cuantitativa a tiempo real y valoración coste-efectividad para incluirla de rutina en laboratorio aplicable al diagnóstico de afectados y portadoras.

### **3.5 Algoritmo de diagnóstico molecular de la hemofilia A**

Con los resultados del presente trabajo de tesis, se diseña un algoritmo que presenta una estrategia de las distintas metodologías para el estudio molecular de un paciente afectado de hemofilia A (Figura 17).

Como ya se explicó en la sección VI de materiales y métodos de esta tesis, ante un caso diagnosticado de HA, lo primero que se hace es obtener una genealogía completa con todos los datos clínicos y de laboratorio que se puedan aportar. Para el diagnóstico molecular, el análisis directo puede complementarse con el indirecto, si hay también muestras de portadoras para estudio familiar. En el caso de no disponer de algún varón afectado de la familia, el análisis molecular directo se realizaría en portadoras obligadas o madres de casos esporádicos. En un primer lugar, se comprueba la presencia de los dos rearrreglos más frecuentes en pacientes con HA grave que son la inversión del intrón 22 (metodología de Rossetti *et al*, 2005) y del intrón 1 (metodología de Tizzano *et al*, 2003). Si bien el estudio de ambas inversiones está indicado primariamente en pacientes graves, en nuestra experiencia, algunos casos nos han llegado mal rotulados como moderados o leves y al ser positivos para la inversión, se rectificó el tipo de hemofilia como grave en el laboratorio de coagulación correspondiente. Además, existe un caso en la literatura que asocia la inversión del intrón 22 a un caso moderado (Deutz-Terlouw *et al*. 1995). De ser negativos, el siguiente paso es el análisis de dosis génica de cada uno de los exones con la técnica del MLPA para descartar grandes duplicaciones y delecciones. Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, esta técnica permite cuantificar todo el gen en un mismo experimento. Nuestro

laboratorio valida los resultados positivos con la metodología de PCR cuantitativa a tiempo real para cada exón individualmente. En el caso de tratarse de una familia con delección o duplicación conocida, sería más conveniente analizar directamente la región involucrada por ésta última técnica. Finalmente, se secuencian todo el gen en busca de cambios puntuales. El resultado final en más del 98% de los casos, es la identificación de la mutación en el afectado y las portadoras. En el caso de mutaciones *missense*, si ésta no se ha descrito previamente en otros pacientes afectados, es menester aplicar los pasos referidos en la sección materiales y métodos, (apartado 2.4, pág. 66). Con todos estos datos podemos informar a la familia de forma correcta y ofrecerle opciones reproductivas como el diagnóstico prenatal o preimplantatorio en los casos indicados (Lavery, 2009).

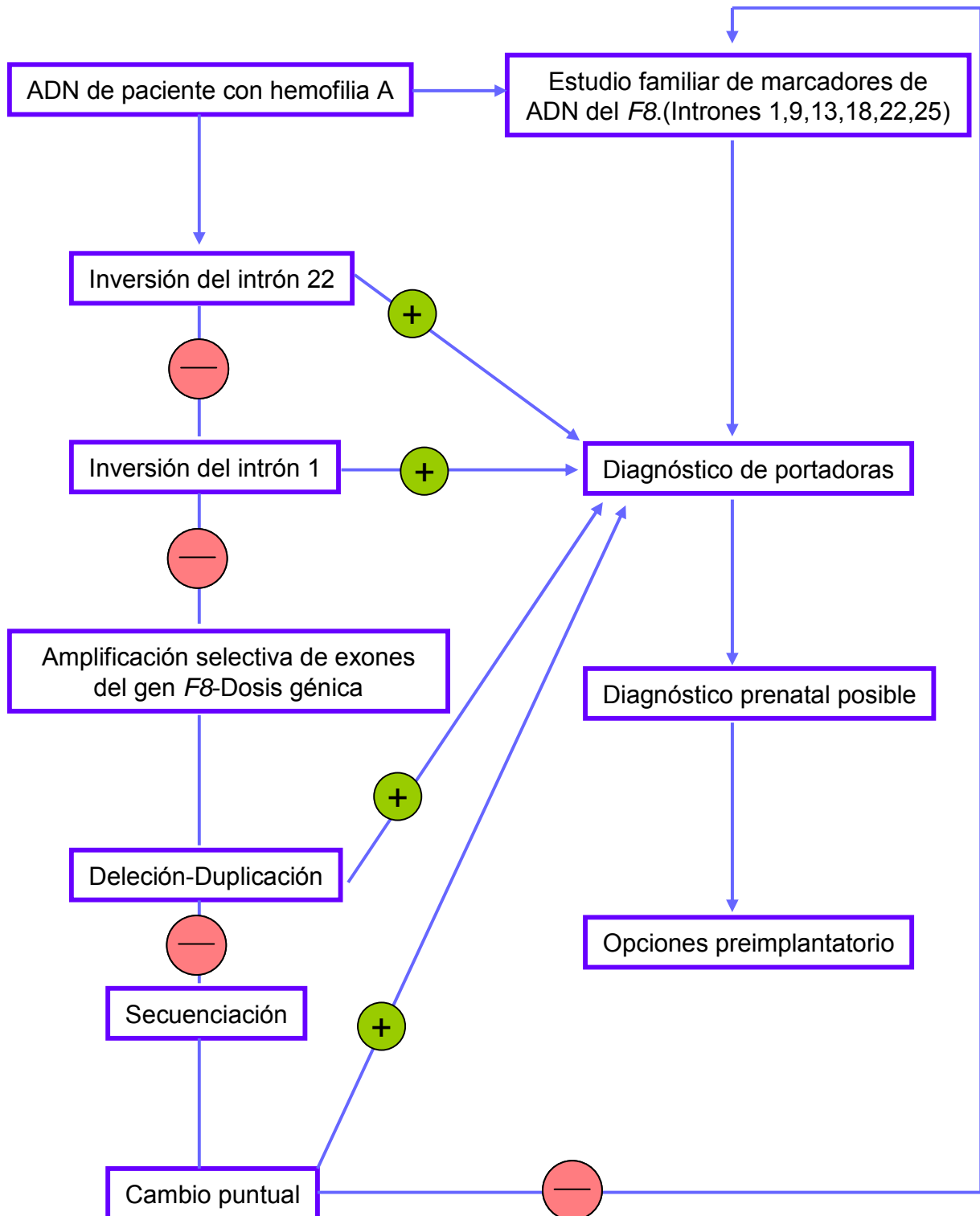


Figura 17. Algoritmo de diagnóstico molecular de la hemofilia A.





## **VIII. CONCLUSIONES**



A continuación se exponen las conclusiones finales derivadas de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral.

### **Identificación de marcadores**

1. La caracterización de los nuevos marcadores situados en el intrón 1, 9 y 25 en el gen del *F8* ha permitido mejorar el diagnóstico molecular indirecto llegando a resolver en conjunto, hasta el 91% de las portadoras con hemofilia A en estudio.

2. El uso de la PCR fluorescente para el estudio de estos marcadores permite un diagnóstico fiable, rápido y sencillo para definir el haplotipo en una familia y coloca a esta técnica, en primera línea para el estudio indirecto en diagnóstico molecular, especialmente aplicable a casos de diagnóstico prenatal y preimplantatorio.

### **Análisis mutacional**

3. El resultado del estudio mutacional en 271 pacientes españoles afectados con hemofilia A con los métodos habituales, ha permitido la detección de la patología molecular en el 98,5% de los casos. La distribución del tipo de mutaciones confirma que la inversión del intrón 22 es la mutación más frecuente en HA (43%), seguida de la totalidad de mutaciones del tipo *missense* (34%).

4. Se han identificado 20 mutaciones *missense* nuevas en el gen *F8* que dan lugar a HA. Su análisis estructural proporciona un mejor entendimiento de las causas de dicha enfermedad y ha permitido clasificarlas en mutaciones de Tipo I (aquellas que provocan una deficiencia cuantitativa del cofactor) y de Tipo II o causantes de una deficiencia cualitativa del FVIII.

5. El análisis estructural también ha permitido predecir el impacto que ocasionan en la estructura de la proteína los cambios puntuales de aminoácidos, en particular, si el plegamiento de la proteína mutada será estable o no. Además, ha contribuido a la comprensión de las consecuencias funcionales de las mutaciones en dicho gen, sugiriendo nuevas áreas del FVIIIa involucradas en la unión a otras macromoléculas, tales como el FIXa y el sustrato del complejo FVIIIa·FIXa, el factor X.

6. El estudio mutacional en las madres de 115 casos esporádicos de HA indicó que la proporción de madres portadoras de la mutación en casos esporádicos con inversión es del

98.27% (57/58) y para el resto de mutaciones del 82.45% (47/57). Los casos restantes se tratarían de mutaciones de *novo* o mosaicismo germinal.

### **Nuevas metodologías**

**7.** En cuatro pacientes del total (1.5%) en los que no se había podido detectar la mutación con la batería de estudios habituales, las técnicas de cuantificación de dosis génica como la PCR cuantitativa en tiempo real y la técnica del MLPA han permitido la identificación de la mutación en dos de ellos. Dichos métodos pueden detectar, tanto las deleciones como las duplicaciones en el gen *F8* ya sea en afectados o en las portadoras.

**8.** En familias cuya patología molecular era la deleción de uno o más exones completos del gen *F8* o la pérdida completa del gen *F9*, el estudio indirecto por marcadores y el estudio directo por técnicas de cuantificación de dosis génicas, de manera complementaria, han permitido establecer el diagnóstico de portadoras en estas familias.

**9.** La aplicación de las técnicas habituales de estudio directo, complementadas con el análisis de marcadores y los estudios de dosis génica han sido útiles en la identificación de la patología molecular de mujeres con hemofilia, ya sea en homocigosis, heterocigosis compuesta o hemicigosis.

**10.** Con la totalidad de metodologías aplicadas en este trabajo de tesis se ha diseñado un algoritmo práctico de análisis para optimizar el diagnóstico molecular de los pacientes con HA y las portadoras de sus familias.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**



- Acquila M, Pasino M, Di Duca M, Bottini F, Molinari AC, Bicocchi MP. "MLPA assay in F8 gene mutation screening". *Haemophilia* 2008 May; 14(3):625-7
- Adams TE, Hockin MF, Mann KG, Everse SJ. "The crystal structure of activated protein C-inactivated bovine factor Va: Implications for cofactor function". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 15; 101(24):8918-23.
- Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG. "The gene structure of human anti-haemophilic factor IX". *EMBO J*. 1984 May; 3(5):1053-60.
- Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, *et al*. "Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study". *Blood*. 1995 Sep 15; 86(6):2206-12.
- Ariëns RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. "The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure". *Blood*. 2000 Aug 1; 96(3):988-95
- Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BL; MIBS Study Group. "The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients". *Haemophilia*. 2001 May; 7(3):267-72.
- Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC 2nd, Berntorp E; "Malmö International Brother Study study group. The Malmö International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A". *Haematologica*. 2005 Jul; 90(7):924-31.
- Astermark J. "Overview of inhibitors". *Semin Hematol*. 2006 Apr; 43(2 Suppl 4):S3-7.
- Astermark J, Donfield SM, DiMichele DM, Gringeri A, Gilbert SA, Waters J, Berntorp E; FENOC Study Group. "A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study". *Blood*. 2007 Jan 15; 109 (2):546-51.



- Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. "Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A". *Blood* 2002 Jan 1; 99(1):168-74.
- Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Saito H, Spitzer SG, Bajaj SP. "Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: evidence that endothelium is the principal site of its síntesis". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Nov; 87(22):8869-73.
- Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. "Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor". *J Biol Chem*. 1995 Jun 16; 270(24):14477-84.
- Bajzar L, Morser J, Nesheim M. "TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex". *J Biol Chem*. 1996 Jul 12; 271(28):16603-8.
- Bajzar L. "Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Dec; 20(12):2511-8
- Baumgartner HR. "The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition, and formation of mural thrombi". *Microvasc Res*. 1973 Mar;5(2):167-79
- Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M. "Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57". *Int Rev Cytol*. 2005; 245:91-121.
- Bennett CM, Boye E, Neufeld EJ. "Female monozygotic twins discordant for hemophilia A due to nonrandom X-chromosome inactivation". *Am J Hematol*. 2008 Oct; 83(10):778-80
- Bitting RL, Bent S, Li Y, Kohlwes J. "The prognosis and treatment of acquired hemophilia: a systematic review and meta-analysis". *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009 Jul 29.
- Blajchman MA. "An overview of the mechanism of action of antithrombin and its inherited deficiency states". *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994 Jan; 5 Suppl 1:S5-11; discussion S59-64

- Blann AD, Lip GY "Virchow`s Triad Revisited: The Importance of Soluble Coagulation Factors, the Endothelium, and Platelets". *Thromb Res* (2001)101: 321-327
- Boekhorst J, Verbruggen B, Lavergne JM, Costa JM, Schoormans SC, Brons PP, van Kraaij MG, Nováková IR, van Heerde WL. "Thirteen novel mutations in the factor VIII gene in the Nijmegen haemophilia A patient population". *Br J Haematol*. 2005 Oct; 131(1):109-17.
- Bontempo FA, Lewis JH, Gorenc TJ, Spero JA, Ragni MV, Scott JP, Starzl TE. "Liver transplantation in hemophilia A". *Blood*. 1987 Jun; 69(6):1721-4.
- Bowen DJ, Keeney S. "Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A". *Thromb Haemost*. 2003 Jan; 89(1):201-2.
- Brogren H, Karlsson L, Andersson M, Wang L, Erlinge D, Jern S. "Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1". *Blood*. 2004 Dec 15; 104(13):3943-8.
- Brown DL, Bray GL, Scharrer I. "Transient inhibitors in patients with hemophilia A" *Thromb Haemost* 1999; 82 (August suppl.): 573, abstract 1804.
- Broze GJ Jr. "Tissue factor pathway inhibitor" *Thromb Haemost*. 1995 Jul; 74(1):90-3.
- Bullock W. Fildes P. "Haemophilia" Eugenics, Laboratory Memoirs. Vol 12-15, 1911.
- Cadroy Y, Diquélou A, Dupouy D, Bossavy JP, Sakariassen KS, Sié P, Boneu B. "The thrombomodulin/protein C/protein S anticoagulant pathway modulates the thrombogenic properties of the normal resting and stimulated endothelium". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Mar; 17(3):520-7.
- Casaña P, Haya S, Cid AR, Oltra S, Martínez F, Cabrera N, Aznar JA. "Identification of deletion carriers in hemophilia B: quantitative real-time polymerase chain reaction or multiple ligation probe amplification". *Transl Res*.2009 Mar;153(3):114-7

- Chan V, Tong TM, Chan TP, Tang M, Wan CW, Chan FY, Chu YC, Chan TK. "Multiple XbaI polymorphisms for carrier detection and prenatal diagnosis of haemophilia A". *Br J Haematol.* 1989 Dec; 73(4):497-500.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders". *Blood.* 1998 May 15; 91(10):3527-61
- Costa C, Jouannic JM, Stieltjes N, Costa JM, Girodon E, Goossens M "Quantitative real-time PCR assay for rapid identification of deletion carriers in hemophilia". *Clin Chem.* 2004 Jul; 50(7):1269-70.
- Dahlbäck B. "The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis" *Thromb Res.* 1995 Jan 1; 77(1):1-43
- Dahlbäck B. "Blood coagulation". *Lancet.* 2000 May 6; 355(9215):1627-32.
- Dahlbäck B, Villoutreix BO. "Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jul; 25(7):1311-20.
- Dai L, Cutler JA, Savidge GF, Mitchell MJ. "Characterization of a causative mutation of hemophilia A identified in the promoter region of the factor VIII gene (F8)". *J Thromb Haemost.* 2008 Jan; 6(1):193-5.
- Dardik R, Kenet G, Kornbrot N, Rosenberg N, Martinowitz U. "Two novel polymorphic microsatellite marker in the FVIII gene useful in haemophilia A diagnosis" *Haemophilia* 2002; 8: 567-8.
- David D, Moreira I, Lalloz MR, Rosa HA, Schwaab R, Morais S, Diniz MJ, de Deus G, Campos M, Lavinha J, et al. "Analysis of the essential sequences of the factor VIII gene in twelve haemophilia A patients by single-stranded conformation polymorphism". *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994 Apr; 5(2):257-64.

- David D, Morais S, Ventura C, Campos M. "Female haemophilic homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles". *Haemophilia*. 2003 Jan; 9(1):125-30.
- David D, Santos IM, Johnson K, Tuddenham EG, McVey JH. "Analysis of the consequences of premature termination codons within factor VIII coding sequences". *J Thromb Haemost*. 2003 Jan;1(1):139-46. Erratum in: *J Thromb Haemost*. 2003 Mar;1(3):618.
- Davie EW, Ratnoff OD. "Waterfall sequence for intrinsic blood clotting" *Science*. 1964 Sep 18; 145:1310-2.
- de Carvalho FM, de Vargas Wolfgramm E, Paneto GG, de Paula Careta F, Spagnol Perrone AM, de Paula F, Louro ID. "Analysis of Factor VIII polymorphic markers as a means for carrier detection in Brazilian families with haemophilia A". *Haemophilia*. 2007 Jul; 13(4):409-12.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. "Nomenclature for the description of human sequence variations". *Hum Genet*. 2001 Jul; 109(1):121-4.
- Deutz-Terlouw PP, Losekoot M, Olmer R, Pieneman WC, de Vries-v d Weerd S, Briët E, Bakker E. "Inversions in the factor VIII gene: improvement of carrier detection and prenatal diagnosis in Dutch haemophilia A families". *J Med Genet*. 1995 Apr;32(4):296-300.
- DiMichele DM, Hoots WK, Pipe SW, Rivard GE, Santagostino E. "International workshop on immune tolerance induction: consensus recommendations". *Haemophilia*. 2007 Jul;13 Suppl 1:1-22
- Eaton DL, Wood WI, Eaton D, Hass PE, Hollingshead P, Wion K, Mather J, Lawn RM, Vehar GA, Gorman C. "Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule". *Biochemistry*. 1986 Dec 30; 25(26):8343-7.
- Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Güngör T, Krackhardt B, Kornhuber B. "Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs". *Lancet*. 1992 Mar 7; 339(8793):594-8.

- Ehrlich HJ, Henzl MJ, Gomperts ED. "Safety of factor VIII inhibitor bypass activity (FEIBA): 10-year compilation of thrombotic adverse events". *Haemophilia*. 2002 Mar; 8 (2):83-90.
- El-Maarri O, Herbiniaux U, Graw J, Schröder J, Terzic A, Watzka M, Brackmann HH, Schramm W, Hanfland P, Schwaab R, Müller CR, Oldenburg J. "Analysis of mRNA in hemophilia A patients with undetectable mutations reveals normal splicing in the factor VIII gene". *J Thromb Haemost*. 2005 Feb; 3(2):332-9.
- El-Maarri O, Singer H, Klein C, Watzka M, Herbiniaux U, Brackmann HH, Schröder J, Graw J, Müller CR, Schramm W, Schwaab R, Haaf T, Hanfland P, Oldenburg J. "Lack of F8 mRNA: a novel mechanism leading to hemophilia A". *Blood*. 2006 Apr 1;107 (7):2759-65.
- Esmon CT, Owen WG. "Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Apr;78(4):2249-52.
- Esmon CT. "The protein C anticoagulant pathway". *Arterioscler Thromb*. 1992 Feb; 12(2):135-45
- Esmon CT. "The endothelial cell protein C receptor". *Thromb Haemost*. 2000 May; 83(5):639-43
- Fair DS, Marlar RA, Levin EG. "Human endothelial cells synthesize protein S". *Blood*. 1986 Apr; 67(4):1168-71.
- Fay PJ, Smudzyn TM, Walker FJ. "Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity". *J Biol Chem*. 1991 Oct 25; 266(30):20139-45.
- Fay PJ, Mastro M, Koszelak ME, Wakabayashi H. "Cleavage of factor VIII heavy chain is required for the functional interaction of  $\alpha 2$  subunit with factor IXA". *J Biol Chem*. 2001 Apr 13; 276(15):12434-9

- Figueiredo MS, Brownlee GG. "cis-acting elements and transcription factors involved in the promoter activity of the human factor VIII gene". *J Biol Chem*. 1995 May 19; 270(20):11828-38.
- Franchini M, Lippi G. Acquired factor VIII inhibitors. *Blood*. 2008 Jul 15; 112(2):250-5.
- Franchini M, Sassi M, Dell'Anna P, Manzato F, Salvagno GL, Montagnana M, Zaffanello M, Targher G, Lippi G. Extracorporeal immunoabsorption for the treatment of coagulation inhibitors. *Semin Thromb Hemost*. 2009 Feb; 35(1):76-80.
- Fujii S, Hopkins WE, Sobel BE. "Mechanisms contributing to increased synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 in endothelial cells by constituents of platelets and their implications for thrombolysis". *Circulation*. 1991 Feb; 83(2):645-51.
- Gailani D, Broze GJ Jr "Factor XI activation in a revised model of blood coagulation". *Science*. 1991 Aug 23; 253(5022):909-12
- García de Frutos P, Fuentes-Prior P, Hurtado B, Sala N. "Molecular basis of protein S deficiency". *Thromb Haemost*. 2007 Sep; 98(3):543-56.
- Gau JP, Hsu HC, Chau WK, Ho CH. "A novel splicing acceptor mutation of the factor VIII gene producing skipping of exon 25". *Ann Hematol*. 2003 Mar; 82(3):175-7. Epub 2003 Feb 13. Erratum in: *Ann Hematol*. 2003 Jun; 82(6):378.
- Gettins PG. "Serpin structure, mechanism, and function". *Chem Rev*. 2002 Dec; 102(12):4751-804.
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. "Characterization of the human factor VIII gene". *Nature*. 1984 Nov 22-28; 312(5992):326-30.
- Goodeve AC, Peake IR. "The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development". *Semin Thromb Hemost*. 2003 Feb; 29(1):23-30

- Guillet B, Lambert T, d'Oiron R, Proulle V, Plantier JL, Rafowicz A, Peynet J, Costa JM, Bendelac L, Laurian Y, Lavergne JM. "Detection of 95 novel mutations in coagulation factor VIII gene F8 responsible for hemophilia A: results from a single institution". *Hum Mutat.* 2006 Jul; 27(7):676-85.
- Hajjar KA, Hamel NM. "Identification and characterization of human endothelial cell membrane binding sites for tissue plasminogen activator and urokinase". *Biol Chem.* 1990 Feb 15; 265(5):2908-16.
- Hay, C.R.M., Ollier, W., Pepper, L., Cumming, A., Keeney, S., Goodeve, A.C., Colvin, B.T., Hill, F.G.H., Preston, F.E. & Peake, I.R.. "HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A". *Thrombosis and Haemostasis* (1997), 77: 234-237.
- Hoffman M, Monroe DM 3rd. "A cell-based Model of Hemostasis". *Thromb Haemost.* 2001 Jun; 85(6):958-65
- Hogg PJ, Jackson CM. "Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: implications for heparin efficacy". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 May; 86(10):3619-23.
- Hollestelle MJ, Thinnis T, Crain K, Stiko A, Kruijt JK, van Berkel TJ, Loskutoff DJ, van Mourik JA. "Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo--a closer look". *Thromb Haemost.* 2001 Sep; 86(3):855-61.
- Hoyer LW. "Hemophilia A". *N Engl J Med.* 1994 Jan 6; 330(1):38-47.
- Huang ZF, Wun TC, Broze GJ Jr. "Kinetics of factor Xa inhibition by tissue factor pathway inhibitor". *J Biol Chem.* 1993 Dec 25; 268(36):26950-5.
- Hutton JC. "Subtilisin-like proteinases involved in the activation of proproteins of the eukaryotic secretory pathway". *Curr Opin Cell Biol.* 1990 Dec; 2(6):1131-42.
- Jacquemin M, Benhida A, Peerlinck K, Desqueper B, Vander Elst L, Lavend`homme R, d'Oiron R, Schwaab R, Bakkus M, Thielemans K, Gilles JG, Vermeylen J, Saint-Remy JM. "A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII

- cofactor activity and binding to von Willebrand factor". *Blood*. 2000 Jan 1; 95(1):156-63.
- Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M, Srivastava A. "Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions". *Haemophilia*. 2005 Sep; 11(5):481-91.
- Kaveri SV, Dasgupta S, Andre S, Navarrete AM, Repessé Y, Wootla B, Lacroix-Desmazes S. "Factor VIII inhibitors: role of von Willebrand factor on the uptake of factor VIII by dendritic cells". *Haemophilia*. 2007 Dec;13 Suppl 5:61-4.
- Kemball-Cook G, Tuddenham EG. "The Factor VIII Mutation Database on the World Wide Web: the haemophilia A mutation, search, test and resource site. HAMSTeRS update (version 3.0)". *Nucleic Acids Res*. 1997 Jan 1; 25(1):128-32.
- Kempton CL, Soucie JM, Abshire TC. "Incidence of inhibitors in a cohort of 838 males with hemophilia A previously treated with factor VIII concentrates". *J. Thromb. Haemost.* 2006 Dec; 4(12):2576-81. Epub 2006 Sep 26. Erratum in: *J Thromb Haemost.* 2007 Mar; 5(3):657.
- Kim JW, Park SY, Kim YM, Kim JM, Kim DJ, Ryu HM. "Identification of new dinucleotide-repeat polymorphisms in factor VIII gene using fluorescent PCR". *Haemophilia* 2005 Jan; 11(1):38-44.
- Klopp N, Oldenburg J, Uen C, Schneppenheim R, Graw J. Klopp N, Oldenburg J, Uen C, Schneppenheim R, Graw J. "11 hemophilia A patients without mutations in the factor VIII encoding gene". *Thromb Haemost.* 2002 Aug; 88(2):357-60.
- Kitchen S, McCraw A. "Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación". *Manual de laboratorio* Pág. 72.
- Lakich D, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Gitschier J. "Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A". *Nat Genet.* 1993 Nov; 5(3):236-41.



- 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 Jul 27; 338(8761):207-11.
- Lalloz MR, Schwaab R, McVey JH, Michaelis K, Tuddenham EG. "Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene". *Br J Haematol*. 1994 Apr; 86(4):804-9.
- Lavery S. "Preimplantation genetic diagnosis of haemophilia". *Br J Haematol*. 2009 Feb;144(3):303-7.
- Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K "Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII". *J Biol Chem*. 1994 Mar 11; 269(10):7150-5.
- Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. "The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function". *Blood*. 1998 Dec 1; 92(11):3983-96.
- Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G Jr, Gitschier J. "A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene". *Genomics*. 1990 May; 7(1):1-11.
- Levinson B, Kenwrick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J. "Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene". *Genomics*. 1992 Nov; 14(3):585-9.
- Lewis JH, Bontempo FA, Spero JA, Ragni MV, Starzl TE. "Liver transplantation in a hemophiliac". *N Engl J Med*. 1985 May 2; 312(18):1189-90.
- Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, Van Mourik JA, Mertens K. "The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII". *Biochem J*. 1989 Feb 1; 257(3):679-83.
- Lijnen HR, Collen D. "Interaction of plasminogen activators and inhibitors with plasminogen and fibrin". *Semin Thromb Hemost*. 1982 Jan;8(1):2-10.

- Lin SR, Lin SW, Hsu YC, Shen MC. "Identification of a new CA dinucleotide repeat in the human factor VIII gene". *Br J Haematol*. 2000 Dec; 111(4):1256-9.
- Liu Q, Nozari G, Sommer SS. "Single-Tube Polymerase Chain Reaction for Rapid Diagnosis of the Inversion Hotspot of Mutation in Hemophilia A". *Blood*. 1998 Aug 15; 92(4):1458-9.
- Lollar P, Hill-Eubanks DC, Parker CG. "Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor". *J Biol Chem*. 1988 Jul 25; 263(21):10451-5.
- Loreth RM, El-Maarri O, Schröder J, Budde U, Herrmann FH, Oldenburg J. "Haemophilia A in a female caused by coincidence of a Swyer syndrome and a missense mutation in factor VIII gene". *Thromb Haemost*. 2006 Apr;95(4):747-8.
- Lozier J."Gene therapy of the hemophilias". *Semin Hematol*. 2004 Oct; 41(4):287-96.
- Lu G, Broze GJ Jr, Krishnaswamy S. "Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III". *J Biol Chem*. 2004 Apr 23; 279(17):17241-9
- Luchtman-Jones L, Broze GJ Jr. "The current status of coagulation" *Ann Med*. 1995 Feb; 27(1):47-52
- Macfarlane Rg. "An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier". *Nature*. 1964 May 2; 202:498-9.
- Machado FB, Duarte LP, Medina-Acosta E. "A novel informative dinucleotide microsatellite marker located on human factor VIII intron 25". *Haemophilia*. 2009 Mar;15(2):613-4.
- Mackman N. "Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development Arterioscler" *Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):1015-22. Epub 2004 Apr 29
- Mann KG, Lawson JH. "The role of the membrane in the expression of the vitamin K-dependent enzymes". *Arch Pathol Lab Med*. 1992 Dec; 116(12):1330-6

- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR. "The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39". *J Clin Invest.* 1997 Mar 15;99(6):1351-60.
- Marquette KA, Pittman DD, Kaufman RJ. "The factor V B-domain provides two functions to facilitate thrombin cleavage and release of the light chain". *Blood.* 1995 Oct 15; 86(8):3026-34.
- Mateo J, Badell I, Forner R, Borrell M, Tizzano E, Fontcuberta J. "Successful suppression using Rituximab of a factor VIII inhibitor in a boy with severe congenital haemophilia: an example of a significant decrease of treatment costs". *Thromb Haemost.* 2006 Feb; 95(2):386-7
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. "Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells". *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11; 16(3):1215.
- Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. "Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets". *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996 Jun; 7(4):459-64
- Naylor JA, Buck D, Green P, Williamson H, Bentley D, Giannelli F." Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions". *Hum Mol Genet.* 1995 Jul; 4(7):1217-24.
- Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, Terry VH, Hertel CE, Wheatley MA, Moussalli 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 Apr 3; 93(1):61-70.
- Nogami K, Shima M, Hosokawa K, Nagata M, Koide T, Saenko EL, Tanaka I, Shibata M, Yoshioka A. "Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at Arg1689". *J Biol Chem.* 2000 Aug 18; 275(33):25774-80.

- Oberlé I, Drayna D, Camerino G, White R, Mandel JL. "The telomeric region of the human X chromosome long arm: presence of a highly polymorphic DNA marker and analysis of recombination frequency". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 May; 82(9):2824-8.
- Oldenburg J, Schröder J, Brackmann HH, Müller-Reible C, Schwaab R, Tuddenham E. "Environmental and genetic factors influencing inhibitor development". *Semin Hematol*. 2004 Jan; 41(1 Suppl 1):82-8.
- Oldenburg J, Pavlova A. "Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX". *Haemophilia*. 2006; 12(suppl 6):15-22
- Osterud B, Rapaport SI. "Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec; 74(12):5260-4.
- Otto J.C. "An account of an haemorrhagic disposition existing in certain families". *Med. Repos*. 6,1-4 (1803)
- Parthiban V, Gromiha MM, Schomburg D. "CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations". *Nucleic Acids Res*. 2006 Jul 1; 34: W239-42.
- Pattinson JK, Millar DS, McVey JH, Grundy CB, Wieland K, Mibashan RS, Martinowitz U, Tan-Un K, Vidaud M, Goossens M, et al. "The molecular genetic analysis of hemophilia A: a directed search strategy for the detection of point mutations in the human factor VIII gene". *Blood*. 1990 Dec 1; 76(11):2242-8.
- Pavlova A, Brondke H, Müsebeck J, Pollmann H, Srivastava A, Oldenburg J. "Molecular mechanisms underlying hemophilia A phenotype in seven females". *J Thromb Haemost*. 2009 Jun; 7(6):976-82.
- Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R, Astermark J, Oldenburg J. "Impact of polymorphisms of the MHC class II, IL-10, TNF- $\alpha$  and CTLA-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A" *J Thromb Haemost*. 2009 Oct 8.

- Peake IR, Lillicrap DP, Boulyjenkov V, Briët E, Chan V, Ginter EK, Kraus EM, Ljung R, Mannucci PM, Nicolaidis K, et al. "Report of a joint WHO/WFH meeting on the control of haemophilia: carrier detection and prenatal diagnosis". *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993 Apr; 4(2):313-44.
- Pemberton S, Lindley P, Zaitsev V, Card G, Tuddenham EG, Kemball-Cook G. "A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin". *Blood*. 1997 Apr 1; 89(7):2413-21
- Petersen LC, Bjørn SE, Olsen OH, Nordfang O, Norris F, Norris K. "Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor". *Eur J Biochem*. 1996 Jan 15; 235(1-2):310-6.
- Pipe SW, Morris JA, Kaufman RJ. "Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin". *J Biol Chem*. 1998 Apr 3; 273(14):8537-44.
- Poustka A, Dietrich A, Langenstein G, Toniolo D, Warren ST, Lehrach H. "Physical map of human Xq27-qter: localizing the region of the fragile X mutation". *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Oct 1; 88(19):8302-6.
- Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL. "Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution". *Nature*. 1999 Nov 25; 402(6760):439-42.
- Preissner KT, Machovich R. "Fibrinolysis and proteolysis in a cellular context". *Thromb Haemost*. 2004 Mar; 91(3):423-4.
- Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF, Ruoslahti E. "Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors". *Science*. 1986 Mar 28; 231(4745):1559-62
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs". *Immunogenetics*. 1999 Nov; 50(3-4):213-9.

- Rezaie AR. "Exosite-dependent regulation of the protein C anticoagulant pathway". *Trends Cardiovasc Med*. 2003 Jan; 13(1):8-15
- Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. "Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex". *Blood*. 2004 Feb 15; 103(4):1192-201.
- Rijken DC, Wijngaards G, Welbergen J. "Immunological characterization of plasminogen activator activities in human tissues and body fluids". *J Lab Clin Med*. 1981 Apr; 97(4):477-86.
- Rick ME, Esmon NL, Krizek DM. "Factor IXa and von Willebrand factor modify the inactivation of factor VIII by activated protein C". *J Lab Clin Med*. 1990 Apr; 115(4):415-21.
- Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. "Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR". *Clin Chem*. 2005 Jul; 51(7):1154-8.
- Rost S, Löffler S, Pavlova A, Müller CR, Oldenburg J. "Detection of large duplications within the factor VIII gene by MLPA". *J Thromb Haemost*. 2008 Nov; 6(11):1996-9.
- Ruggeri ZM. "Platelets in atherothrombosis" *Nat Med*. 2002 Nov; 8(11):1227-34.
- Ruggeri ZM. "Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions". *J Thromb Haemost*. 2003 Jul; 1(7):1335-42
- Saenko EL, Scandella D. "The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor". *J Biol Chem*. 1997 Jul 18; 272(29):18007-14.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec; 74(12):5463-7.
- Scharrer I, Bray GL, Neutzling O. "Incidence of inhibitors in haemophilia A patients--a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates". *Haemophilia*. 1999 May; 5(3):145-54

- Schulze H, Shivdasani RA "Mechanisms of thrombopoiesis". *J Thromb Haemost.* 2005 Aug; 3(8):1717-24
- Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham EG, Oldenburg J. "Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation". *Thromb Haemost.* 1995 Dec; 74(6):1402-6.
- Schwartz ML, Pizzo SV, Hill RL, McKee PA. "Human Factor XIII from plasma and platelets. Molecular weights, subunit structures, proteolytic activation, and cross-linking of fibrinogen and fibrin". *J Biol Chem.* 1973 Feb 25; 248(4):1395-407.
- Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL. "The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII". *Blood.* 2008 Feb 1; 111(3):1240-7.
- Shima M, Scandella D, Yoshioka A, Nakai H, Tanaka I, Kamisue S, Terada S, Fukui H. "A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine". *Thromb Haemost.* 1993 Mar 1; 69(3):240-6.
- Spreafico M, Peyvandi F. "Combined Factor V and Factor VIII Deficiency". *Semin Thromb Hemost.* 2009 Jun; 35(4):390-9.
- Spronk HM, Govers-Riemslog JW, ten Cate H. "The blood coagulation system as a molecular machine". *Bioessays.* 2003 Dec; 25(12):1220-8.
- Stamler JS, Vaughan DE, Loscalzo J. "Synergistic disaggregation of platelets by tissue-type plasminogen activator, prostaglandin E1, and nitroglicerina". *Circ Res.* 1989 Sep; 65(3):796-804.
- Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. "The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 17; 93(19):10212-6.

- Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, Kaufman RJ. "Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII". *J Biol Chem*. 1997 Sep 26; 272(39):24121-4.
- Tizzano EF, Altisent C, Domènech M, Cornet M, Tusell J, Baiget M. "Inhibitor development in haemophilia A patients with inversion of the intron 22 of the factor VIII gene". *Thromb Haemost*. 1996 Jul; 76(1):125-6
- Tizzano EF, Cornet M, Baiget M. "Inversion of intron 1 of the factor VIII gene for direct molecular diagnosis of hemophilia A". *Haematologica*. 2003 Jan; 88(1):118-20
- Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, Kaufman RJ, Brown E, Shoemaker C, Orr EC, et al "Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor". *Nature*. 1984 Nov 22-28; 312(5992):342-7.
- Tuddenham EG, McVey JH. "The genetic basis of inhibitor development in haemophilia A". *Haemophilia*. 1998 Jul; 4(4):543-5.
- Valleix S, Jeanny JC, Elsevier S, Joshi RL, Fayet P, Bucchini D, Delpech M. "Expression of human F8B, a gene nested within the coagulation factor VIII gene, produces multiple eye defects and developmental alterations in chimeric and transgenic mice". *Hum Mol Genet*. 1999 Jul; 8(7):1291-301.
- van Boven HH, Lane DA. "Antithrombin and its inherited deficiency states". *Semin Hematol*. 1997 Jul; 34(3):188-204
- White GC 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J; "Factor VIII and Factor IX Subcommittee "Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis". *Thromb Haemost* 2001 Mar; 85(3):560
- Windsor S, Lyng A, Taylor SA, Ewenstein BM, Neufeld EJ, Lillicrap D. "Severe haemophilia A in a female resulting from two de novo factor VIII mutations". *Br J Haematol*. 1995 Aug; 90(4):906-9.



Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. "Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues". *Nature*. 1985 Oct 24-30; 317(6039):726-9.

Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, Keyt B, Seeburg PH, Smith DH, Hollingshead P, Wion KL, et al. "Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones". *Nature*. 1984 Nov 22-28; 312(5992):330-7.

Wright IS. "The nomenclature of blood clotting factors". *Thromb Diath Haemorrh*. 1962 May 15; 7:381-8.

Zwaal RF. "Membrane and lipid involvement in blood coagulation". *Biochim Biophys Acta*. 1978 Jul 31; 515(2):163-205.

## **X. ANEXOS**



**CLINICAL AND GENETIC FINDINGS IN SIX FEMALE PATIENTS WITH  
HAEMOPHILIA A**

*Sometido Haematol/2009/019802*

Mónica Martn-Salces, Adoración Venceslá, María Teresa Álvarez Román,  
Isabel Rivas, Ihosvany Fernández, Nora Butta, Manel Baena,  
Pablo Fuentes-Prior, Eduardo F. Tizzano, Víctor Jiménez-Yuste



## Clinical and genetic findings in six female patients with haemophilia A

Mónica Martín-Salces<sup>1</sup>, Adoración Venceslá<sup>2</sup>, María Teresa Álvarez Román<sup>1</sup>,  
Isabel Rivas<sup>1</sup>, Ihosvany Fernández<sup>1</sup>, Nora Butta<sup>1</sup>, Manel Baena<sup>2</sup>,  
Pablo Fuentes-Prior<sup>3</sup>, Eduardo F. Tizzano<sup>2</sup>, Víctor Jiménez-Yuste<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haematology Department, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain;  
<sup>2</sup>Department of Genetics and <sup>3</sup>Research Institute, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,  
08025 Barcelona, Spain

Correspondence to:

Mónica Martín-Salces

Tel.: +34912071942, Fax: +34917277226

E-mail: monicamsalces@gmail.com

Running title: Molecular mechanisms of haemophilia A in females

Financial support:

This work was supported by Real Fundación Victoria Eugenia, Fundació Catalana d'Hemofilia and SAF2007-64140 from Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain.

### Summary

Severe manifestations of X-linked recessive disorders such as haemophilia A (HA) are rare in females. Here we describe the clinical and genetic findings in six female HA patients from three different Spanish families. One patient with severe disease was a unique case in the family and her F8 gene analysis demonstrated that she was compound heterozygous (deletion of exons 1-22 and p.Phe652/653 deletion). In a second family, 3 sisters born to consanguineous parents presented moderate bleeding due to a known mutation (p.Ser1791Pro) detected in a homozygous state. In a third family, 2 sisters with Morris syndrome (46,XY) and mild/moderate illness were hemizygous for a novel missense mutation, p.Phe2127Ser. The mutation is predicted to impair binding to the factor VIII carrier protein, von Willebrand factor, and thus increased clearance of FVIII from plasma. Clinical

and molecular characterisation of these patients is essential to optimise follow-up, genetic counselling and treatment of the disease. (151 words)

**Keywords**

Haemophilia A, females, F8 gene, mutations, von Willebrand factor

## Introduction

Haemophilia A (HA) is an X-linked recessive bleeding disorder caused by mutations in the F8 gene. This gene is located on the long arm of the X chromosome and encodes the essential coagulation factor VIII (FVIII) (for reviews see refs. (1, 2)). HA is classified as mild, moderate or severe, depending on the amount of residual FVIII activity (FVIII:C). The molecular basis underlying the disease is well characterised and about half of the severely affected individuals have large genomic inversions disrupting the F8 gene. In the remaining patients HA is the result of a variety of mutations in the F8 gene, including small and large deletions, insertions, and non-sense and missense mutations ((3) and references therein). About 90% of mutations in HA patients can be traced back to parents or grandparents, while the remaining mutations arise spontaneously (1).

The incidence of HA is approximately 1 per 5000 male births. HA is transmitted by females (carriers), who are usually asymptomatic given that they show normal or intermediate levels of FVIII:C. Severe manifestations of X-linked recessive disorders are rare in females (4-7). In particular, it is estimated that 1 out of 100,000 females is a symptomatic HA carrier (4). A number of pathophysiological mechanisms may account for the phenotypic expression of very low FVIII:C levels in this setting. These include: (I) compound heterozygous mutations affecting both F8 alleles (4, 5, 8, 9), (II) homozygous mutations (6, 10), (III) extreme lyonization leading to the inactivation of the normal X chromosome (11-13), (IV) abnormalities of the X chromosome structure or number, as occurs in Turner syndrome (14, 15), and (V) a mutant gene plus an XY genotype manifesting as a female phenotype (16, 17).

Descriptions of females with HA are uncommon in the medical literature. Here we report unusual characteristics of six female HA patients followed up in our Centre, including a new missense mutation.

## Materials and methods

### *Patients*

A retrospective study was conducted in our centre in September 2008 to identify cases of HA in female patients and to analyse the molecular mechanism of the disease-causing F8 gene defect, the severity of haemophilia, the phenotype and type of treatment (demand or prophylaxis). Clinical and demographic data were collected from patients' records: age at diagnosis, family history of HA, FVIII activity, inhibitors, bleeding episodes and treatment received.



### *Functional analysis*

Peripheral blood was collected in 0.1 volume of 3.8% (w/v) tri-sodium citrate (18). FVIII activity was measured using a chromogenic substrate assay (19) and FVIII inhibitor activity was determined using the Bethesda method (20). Standard and G-band chromosome analyses were also performed according to published procedures (21).

### *Genetic analysis*

DNA was extracted from EDTA-anticoagulated blood by standard methods. F8 genes of the probands and their closest family members were studied by direct DNA sequencing, marker analysis and quantitative real-time polymerase chain reaction as previously described (3, 5). DNA from 100 Spanish non-haemophiliacs was used as control of the novel DNA changes detected in the current investigation.

### *Structural analysis*

The functional consequences of the novel missense mutation, p.Phe2127Ser, were predicted based on reported three-dimensional crystal structures for activated FVIII (PDB code 2R7E; ref. (22), and 3CDZ, ref. (23)), as well as the high-resolution structures of C2 domains from FV (1CZT, ref. (24)) and FVIII (1D7P; (25)). Information about known mutations was extracted from the HAMSTeRS database (<http://europium.csc.mrc.ac.uk>) or from cited references. Structure figures were generated with PyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)).

## **Results**

Six female HA patients belonging to three different families were identified from our database of haemophiliac patients. Median age was 8 years old (range: 5-20 years). The pedigrees of the families are shown in Figure 1. Patients' characteristics are summarised in Table 1 and the results of genetic studies in Table 2.

### *Family 1* (one affected female)

Patient 1 debuted with a haematoma in her right arm following a venous puncture at the age of seven months. In the first year she had a haematoma in the right gluteus region and haemarthrosis in the left knee. These bleeding episodes were treated with FVIII concentrate for five days. A port-a-cath was inserted as haemostatic cover with FVIII infusion, with no complications related to the procedure. At two years of age, a secondary prophylaxis schedule was initiated with FVIII concentrate. The patient is presently five years old and is doing well on prophylactic therapy with FVIII concentrate three times a week. Genetic studies revealed two different mutations in the F8 gene: 1) A large deletion encompassing at least

exons 1 to 22. This mutation was present in the patient, her sister and her mother. 2) A deletion at nucleotide position 2016 in exon 13, corresponding to codon 652 or 653. This deletion predicts the absence of a phenylalanine in domain A2 of coagulation factor VIII. The mutation was not detected in her parents or her sister and could therefore be the result of a de novo or a germinal mosaicism event. This case has been published previously by Venceslá et al. (5).

#### Family 2 (three consanguineous sisters)

The family medical history revealed that the parents of these three sisters were cousins; the father had mild HA and the mother was a carrier of the disease (Fig. 1).

Patient 2: At the age of 20 months she debuted with a post-traumatic haematoma in the right gluteus region. This bleeding episode responded well to the infusion of FVIII concentrate over ten days.

Patient 3 has no history of bleeding.

Patient 4: She was diagnosed at 8-years old following the appearance of a post-traumatic haematoma in the gluteus region. She required hospitalisation on three occasions for post-traumatic haematomas in the gluteus region. These bleeding episodes responded well to the infusion of FVIII concentrate. At the age of 18, three months after a vaginal delivery, she presented in our centre with a haemoperitoneum caused by a ruptured ovarian follicle. The haemorrhage was controlled with intravenous bolus infusions of FVIII concentrate (50 U/kg) for 10 days to provide a 100% correction in the FVIII level. Oral contraceptive treatment was started with the aim of preventing any further menorrhagia. At 20 years old she presented two episodes of haemarthrosis in her left knee. She was treated as an outpatient with FVIII concentrate for ten days.

The genetic study of the father revealed a T>C change that predicts the replacement of serine by proline at codon 1791 of exon 16. As their mother was a carrier of the same mutation our patients were homozygous for the p.Ser1791Pro mutation.

#### Family 3 (two 46,XY sisters with female phenotype)

Patients 5 and 6 are sisters diagnosed of androgen insensitivity syndrome (Morris syndrome). This X-linked disease is characterised by variable defects in virilisation in 46,XY individuals, caused in turn by mutations in the androgen receptor gene (AR). Patients with this syndrome have a normal male genotype but a female phenotype. A missense mutation (p.Arg855His) in the AR gene was detected in both sisters confirming the diagnosis.

Patient 5: At 1 year old she presented haemorrhage following gonadectomy and vaginal reconstruction. One year later she presented upper labial frenum bleeding following a fall on her face. Treatment with FVIII or DDAVP was not needed in either episode. At the age of six she presented a post-traumatic mild haemarthrosis in the left knee and was treated with two

doses of DDAVP. Following a trauma just ten days later she again presented a haemarthrosis of the left knee and intramuscular bleeding in the left leg. She was treated with FVIII infusion for six days.

Patient 6: At the age of three years she presented a post-traumatic mild haemarthrosis in the left ankle and was treated with a dose of DDAVP.

The genetic study of these patients revealed a T>C mutation in exon 23 of the F8 gene that predicts the replacement of phenylalanine by serine at codon 2127 (p.Phe2127Ser). Their mother was a carrier of this mutation. This mutation has not been described previously in haemophilic patients, and we did not identify it in DNA from 100 Spanish non-haemophiliacs or in at least 200 Spanish HA patients, suggesting that this change is a novel mutation rather than a rare polymorphism. A number of observations strongly suggest that replacement of Phe2127 in human FVIII by a polar side chain is unlikely to induce gross structural alterations; mutant p.Phe2127Ser might thus correctly fold and be secreted normally. The mild/moderate phenotype associated with this novel mutation appears to result from impaired interactions with the carrier protein, vWF (see Discussion).

## Discussion

HA in female patients is usually due to mutations in homozygous or heterozygous states, mutations in one X chromosome plus extreme X chromosome inactivation, numerical or structural abnormalities of the X chromosome, or a mutated gene plus XY genotype with a female phenotype (6).

In female patients without family history of HA and with deficient FVIII clotting activity (FVIII:C) it is important to exclude von Willebrand disease or elevated anti-FVIII inhibitory activity (6). Some misdiagnosed female HA cases have proven to be von Willebrand disease type 2N (Normandy), resulting in decreased FVIII binding capacity (26). Indeed, HA is uncommon in female patients, and cases with extremely low FVIII activity and severe bleeding symptoms, as observed in our study, are rarely reported. Women with severe HA present recurrent haemorrhages, especially in joints, muscles and soft tissues, as in males.

Patient 1 in our series presented severe HA with muscular haematomas and haemarthrosis. To prevent recurrent haemarthrosis, chronic synovitis and arthropathy, prophylaxis with factor VIII concentrate was initiated and she has not presented further episodes of bleeding. HA in this patient was the result of compound heterozygous mutations affecting both F8 alleles: the paternal copy of the F8 gene has a de novo deletion of three base pairs in exon 13, which predicts the absence of a phenylalanine in domain A2 of FVIII protein (p.

Phe652/653 del), while the maternally inherited copy of the gene shows a large deletion encompassing exons 1 to 22 (5).

The simultaneous occurrence of two mutations in females with HA has been documented in several cases. Windsor et al. (8) described a girl with severe HA, resulting from two de novo *F8* mutations: a *F8* inversion in her paternal chromosome and a deletion in the long arm of the X chromosome that included the *F8* gene. Seeler et al. (9) described a girl that inherited an *F8* intron 22 inversion from her mother and a de novo *F8* inversion from her father. The paternally-derived X chromosome had been preferentially inactivated in more than 95% of her somatic cells. In a similar case of a female with two inversions, reported by David et al. (6), the severe HA was the result of a maternally inherited *F8* gene inversion and a paternally inherited de novo *F8* gene inversion. These investigators found transcriptional inactivation of the maternal *F8* allele. Cai et al. (4) presented a female patient with moderate HA due to a novel missense mutation inherited from her mother and a de novo frameshift mutation in the other X chromosome. Finally, Pavlova et al. (18) described two cases with mild/moderate HA resulting from homozygous mutations in the *F8* gene: p.Arg593Cys and p.Tyr1680Phe, respectively. These patients were born from a consanguineous marriage between a haemophilic father and a carrier mother.

Similar to the latter case, our patients from family 2 (patients 2-4) were also born from a consanguineous marriage of a haemophilic father and a carrier mother. They inherited a p.Ser1791Pro missense mutation from both parents. Clinical manifestations in these patients were different ranging from absence of bleeding episodes (sister 3) to hospitalisation for posttraumatic gluteus muscle haematoma (sisters 2 and 4). The mutation has been described previously in two HA patients presenting mild HA (27). The mutation affects a buried serine within a long loop in FVIII A3 domain; its replacement by a rigid proline appears to be well tolerated. Interestingly, a similar mutation of the topologically equivalent residue in domain A1 has been reported (p.Ser104Pro), which results in moderate bleeding (28).

Patients 5 and 6 (third family) presented mild HA and Morris syndrome. Also known as androgen insensitivity syndrome, Morris syndrome is an X-linked disease characterised by variable defects in virilisation of 46,XY individuals. This genetic disease is caused by mutations in the androgen receptor gene, which result in peripheral androgen resistance. Affected individuals present with female external genitalia and short vaginas together with intra-abdominal, inguinal or labial testes, but lack of Müllerian structures. Similar to the current cases, Loreth and coworkers have described a patient with a Swyer syndrome and mild haemophilia (16). Patients with Swyer syndrome have a normal male genotype but a female phenotype caused by a failure in male gonadal differentiation. Swyer syndrome has been associated with mutations in at least four genes: SRY, NR5A1, DHH and NR0B1.

Interestingly, mutations in the latter gene are inherited in an X-linked recessive mode. As in the case of Morris syndrome, individuals with Swyer syndrome are typically raised as females and have a female gender identity.

In HA patients 5 and 6, study of the *F8* gene revealed a novel T>C change at position 2127 that predicted a replacement of phenylalanine by serine inherited from their mother. Mutation p.Phe2127Ser replaces a fully exposed, bulky aromatic residue by a smaller and polar serine in FVIII domain C1 (22, 23, 25). We notice that the topologically equivalent residue in FVIII C2 module is occupied by a glutamine in most vertebrates, including humans, and other species present a charged Lys/Arg side chain at this position (Fig. 2). Further, the equivalent residues in both C1 and C2 domains from the homologous coagulation factor V usually possess polar/charged side chains (e.g., Asn / Gln in human FV). These observations suggest that replacement of Phe2127 in human FVIII by a serine is unlikely to induce gross structural alterations; mutant p.Phe2127Ser might thus correctly fold and be normally secreted.

Therefore, the most plausible explanation for the bleeding phenotype associated with the Phe2127→Ser mutation is the disruption of an important interaction site. The mutated phenylalanine is located  $\approx 25$  Å above the membrane-binding “spikes” (24), and thus not expected to interact with procoagulant phospholipid membranes. Instead, other proteins are the most likely binding partners for Phe2127 and neighbouring side chains; current evidence suggests reduced affinity for vWF and thus premature clearance of mutated FVIII molecules as the major molecular defect in variant p.Phe2127Ser.

Indeed, a thorough investigation of mutations scattered across the C1 domain has revealed impaired binding to the FVIII carrier as the common molecular mechanism leading to mild/moderate HA (29). Of particular note, all five FVIII variants studied by Jacquemin and coworkers (p.Ile2098Ser, p.Ser2119Tyr, p.Asn2129Ser, p.Arg2150 and p.Pro2153Gln) are located close to Phe2127, not only along the amino acid sequence (Fig. 2) but also in the three-dimensional structure (Fig. 3). A number of additional mutations that affect C1 residues also reduce binding to vWF (p.Gln2087Glu, p.Arg2090Cys, as well as the recurrent *F8* mutations, p.Arg2150Cys and p.Arg2159Cys; ref. (30)).

Further, lower affinity for vWF might also explain the mild/moderate HA associated with mutations p.His2155Asp (31) and p.Ile2098Phe (32). Replacement of the strictly conserved Phe2126 (Fig. 2) by cysteine has been detected in at least three different hemophiliacs, with rather different consequences. Wasseem and coworkers report two cases, one suffering from moderate and severe hemophilia each (33). By contrast, a mild phenotype has been associated with this mutation in an independent investigation (34). However, it must be stressed that some of these residues (e.g., Ile2098, Phe2126) are buried in the protein core,

and thus reduced binding to vWF is not indicative of direct protein-protein contacts with the carrier, but points to a disruption of the local fold instead. Severe HA also accompanies a mutation that mirrors our current case, p.Ser2099Phe (35), although the bulkier phenylalanine side chain might be accommodated without large structural rearrangements. Interestingly, some of the topologically equivalent residues in domain C2 have been found mutated (e.g., Arg2307, which corresponds to Arg2150), also resulting in impaired vWF binding (30).

In summary, the newly identified mutation in the F8 gene, p.Phe2127Ser, does not seem to interfere with protein synthesis, compromise proper folding of the coagulation factor, or inhibit its secretion. Instead, the bleeding phenotype in patients 5 and 6 seems to result from the reduced affinity of the mutant protein for its carrier, vWF, which leads to reduced plasma stability. Comparison with other reported mutations suggests that Phe2127 is an important element of an extended vWF-binding surface that includes other hydrophobic/aromatic side chains such as Met2124, as well as several charged (e.g., Lys2136, His2155), and polar residues (Ser 2119, Asn2138). Conceivably, none of the reported replacements is able to completely disrupt the protein-protein interface and the vWF·FVIII complex can still be formed, explaining that in the large majority of cases these mutations are associated with mild or moderate HA.

Indeed, the most frequently described cause of haemophilia A in female patients is selective inactivation of the normal X chromosome in females harbouring a mutation in one of their F8 genes (36). Female carriers of haemophilia A may have normal or intermediate factor VIII activity levels depending on the variable mosaicism of their somatic cells in which either the normal or the mutated X chromosome is active (37). These females are usually asymptomatic because X chromosome inactivation is random and approximately equal proportions of both populations of somatic cells are affected. However, in rare instances, a nonrandom X chromosome inactivation could result in a symptomatic female in whom the normal X chromosome is predominantly inactive (11). None of the HA females in our series follow this model.

In summary, our series represents extremely unusual cases of females manifesting HA and highlights the importance of clinical and molecular characterisation in order to provide adequate follow-up, treatment and genetic counselling.

## Disclosures

Conflict of interest: none.

Redundant publications

No substantial overlap with previous papers.

## Tables

**Table 1:** Characteristics of the female HA patients reported in this study.

Family	Patient	Age at diagnosis	Consanguinity	FVIII: C (%)	Clinical features	Treatment
1	1	7 months	No	<1	Intramuscular bleeding; haemarthroses	Prophylaxis
2	2	2 years	Yes	9	Post-traumatic intramuscular bleeding	On-demand
	3	8 years	Yes	5	No bleeding symptoms	On-demand
	4	4 years	Yes	7	Post-traumatic intramuscular bleeding; post-traumatic haemarthroses; haemoperitoneum	On-demand
3	5	2 years	No	48	Postoperative bleeding; mucous bleeding; post-traumatic intramuscular bleeding; post-traumatic haemarthroses	On-demand
	6	5 years	No	45	Post-traumatic mild haemarthroses	On-demand

**Table 2:** Mutation, karyotype results and molecular mechanism of the disease in the 6 HA females described in this study.

Patient	Pathogenic genotype		Karyotype	Molecular mechanism
	<i>Maternal allele</i>	<i>Paternal allele</i>		
1	Gross deletion of exons 1-22 (inherited)	p.Phe652/653 del (de novo)	XX	Compound heterozygous mutations affecting both F8 alleles
2	p.Ser1791Pro (inherited)	p.Ser1791Pro (inherited)	XX	Homozygosity for the mutation
3	p.Ser1791Pro (inherited)	p.Ser1791Pro (inherited)	XX	Homozygosity for the mutation
4	p.Ser1791Pro (inherited)	p.Ser1791Pro (inherited)	XX	Homozygosity for the mutation
5	p.Phe2127Ser (inherited)	–	XY	One mutant gene and XY genotype
6	p.Phe2127Ser (inherited)	–	XY	One mutant gene and XY genotype

## Figure Legends

**Figure 1:** Pedigrees of the three HA families analysed in the current investigation.

**Figure 2:** Partial, multiple sequence alignment around the FVIII residue mutated in patients 5 and 6, Phe2127. The amino acid sequences of C1 domains and those of topologically equivalent C2 modules are included in the alignment, based on deposited FVIII sequences from human (GenBank accession code AAA52484), red-bellied titi monkey (*Callicebus moloch*; ACB21238), common marmoset (*Callithrix jacchus*; ABZ10504), bovine (BAH23430), horse (XP\_001498954), pig (AAB06705), dog (AAC05384), rabbit (ACA42556), mouse (AAA37385), rat (AAQ21580), nine-banded armadillo (*Dasybus novemcinctus*; ACO95359), greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*; ACC68917), chicken (XP\_420193), zebra finch (*Taeniopygia guttata*; XP\_002187514), and pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*; CAG09735). Residues strictly conserved in the C1 and C2 modules of all mammals are white with green shading; other conservative replacements are shaded gray. Mutations identified in HA patients are given below the sequence of human FVIII C1 domain; the current mutant is highlighted in red letters and those shown to impair vWF binding are underlined. The secondary structure indicated below the alignment corresponds to the high-resolution structure of isolated FVIII C2 domain (PDB 1D7P).

**Figure 3:** Location of Phe2127 on the three-dimensional structure of activated FVIII. A) Solid surface representation of the three-dimensional structure of human FVIIIa. Domains are colour-coded and labelled, while Phe2127 and neighbouring residues mutated in other haemophiliacs are coloured red. B) Close-up around residue Phe2127. For simplicity, only side chains of this and other neighbouring residues mutated in HA patients are included in this drawing (red), while main chain atoms of the remaining residues are shown colour-coded according to atom type. Selected hydrogen bonds are also shown. Notice that Phe2127 is fully exposed, and is surrounded by several at least partially exposed side chains of other residues that have been found mutated in other haemophiliacs, in most cases associated with a mild phenotype (e.g., p.Lys2136Glu, Gallardo et al., unpublished data; p.Asn2138Asp; ref. (34); and p.Gln2100Arg, refs. (35, 38)).



## Figures

Figure 1

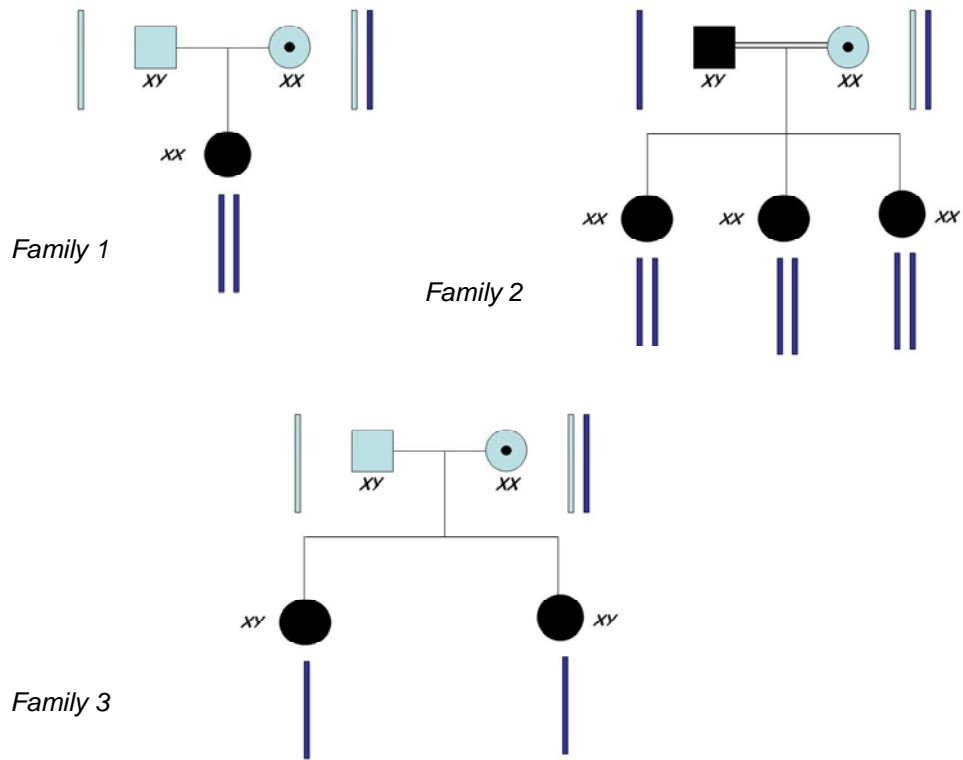


Figure 2

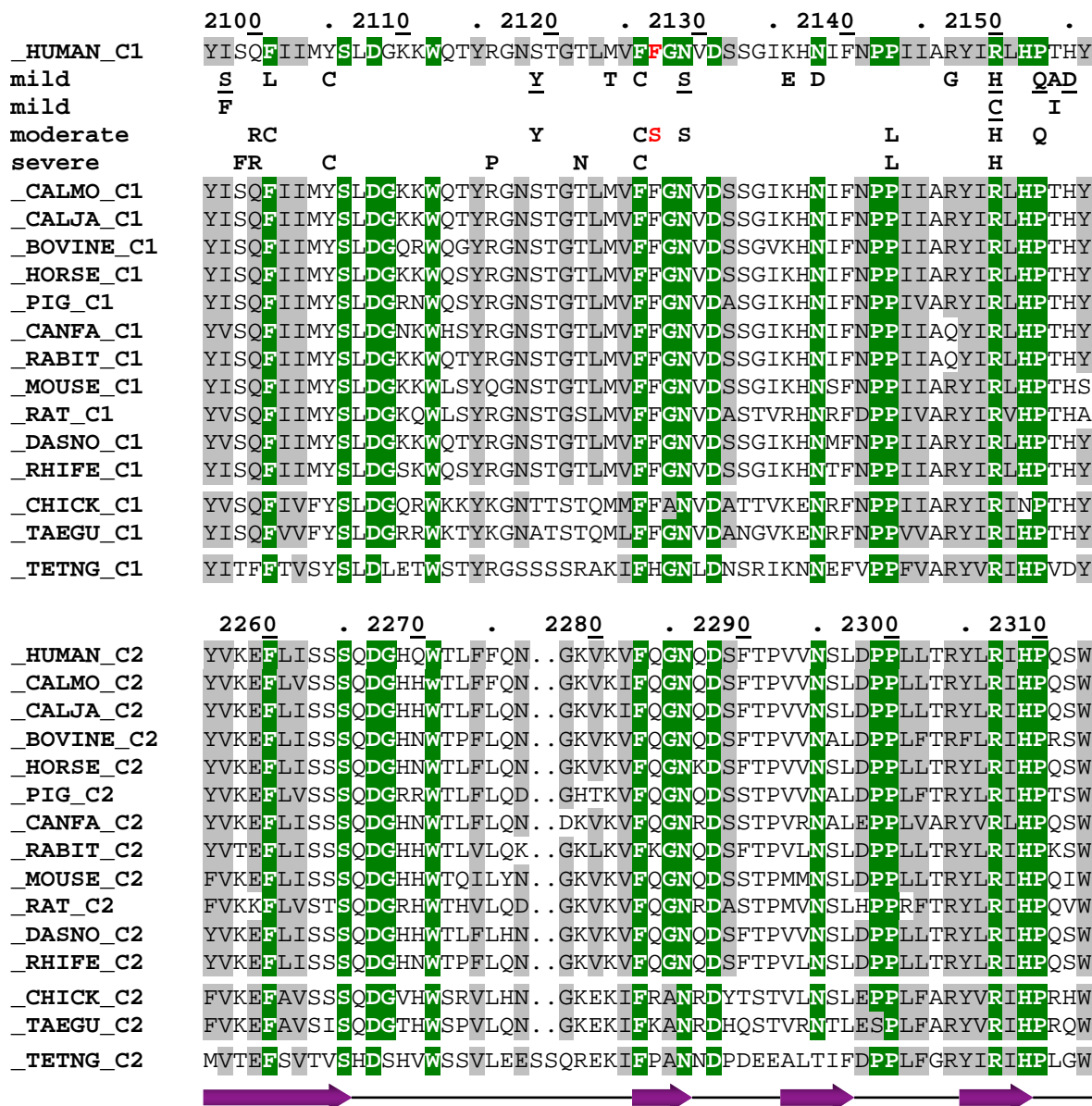


Figure 3A

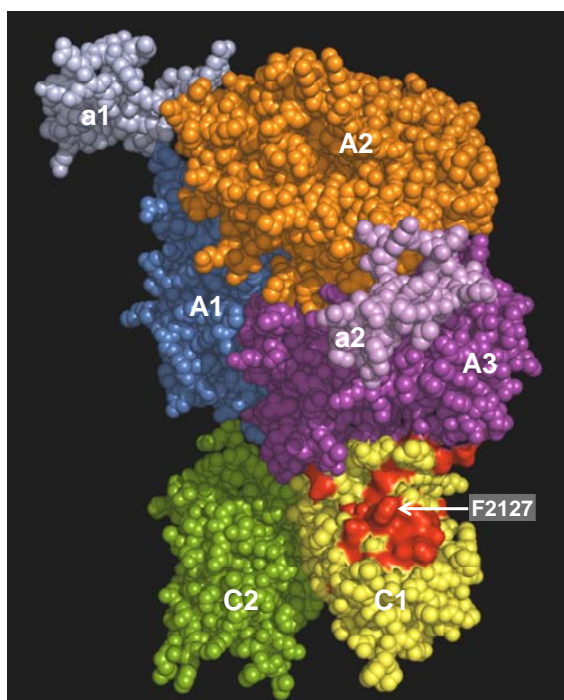
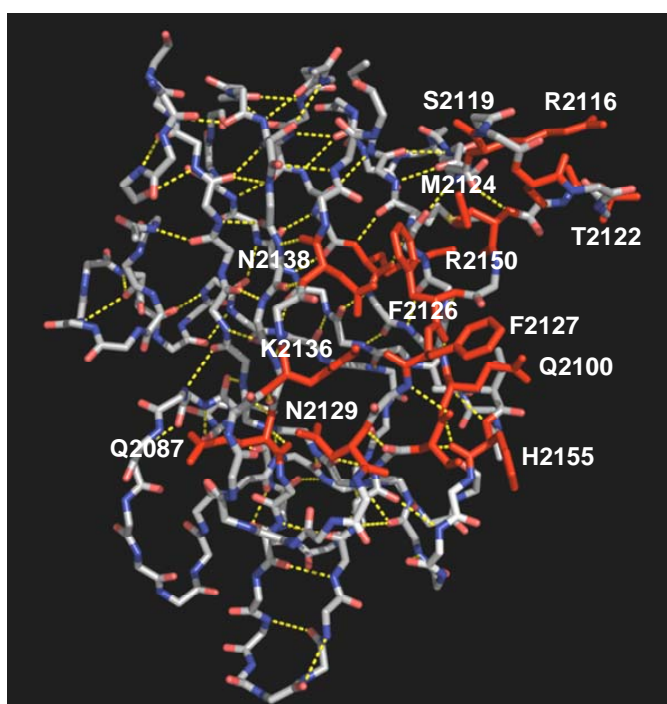


Figure 3B



---

## References

1. Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, et al. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet* 2005;6(6):488-501.
2. Fay PJ, Jenkins PV. Mutating factor VIII: lessons from structure to function. *Blood Rev* 2005;19(1):15-27.
3. Vencesla A, Corral-Rodriguez MA, Baena M, et al. Identification of 31 novel mutations in the F8 gene in Spanish hemophilia A patients - Structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites. *Blood* 2008 January 9, 2008: blood-2007-08-108068.
4. Cai XH, Wang XF, Dai J, et al. Female hemophilia A heterozygous for a de novo frameshift and a novel missense mutation of factor VIII. *J Thromb Haemost* 2006 Sep;4(9):1969-74.
5. Vencesla A, Fuentes-Prior P, Baena M, et al. Severe haemophilia A in a female resulting from an inherited gross deletion and a de novo codon deletion in the F8 gene. *Haemophilia* 2008 Sep;14(5):1094-8.
6. David D, Morais S, Ventura C, et al. Female haemophiliac homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of the factor VIII alleles. *Haemophilia* 2003 Jan; 9(1):125-30.
7. Martin-Salces M, Jimenez-Yuste V, Alvarez MT, et al. Haemoperitoneum in a female patient with haemophilia A caused by a ruptured ovarian follicle. *Haemophilia* 2007 Nov;13(6):770-1.
8. Windsor S, Lyng A, Taylor SA, et al. Severe haemophilia A in a female resulting from two de novo factor VIII mutations. *Br J Haematol* 1995 Aug; 90(4):906-9.
9. Seeler RA, Vnencak-Jones CL, Bassett LM, et al. Severe haemophilia A in a female: a compound heterozygote with nonrandom X-inactivation. *Haemophilia* 1999 Nov;5(6):445-9.
10. Morita H, Kagami M, Ebata Y, et al. The occurrence of homozygous hemophilia in the female. *Acta Haematol* 1971;45(2):112-9.
11. Favier R, Lavergne JM, Costa JM, et al. Unbalanced X-chromosome inactivation with a novel FVIII gene mutation resulting in severe hemophilia A in a female. *Blood* 2000 Dec 15;96(13):4373-5.
12. Bennett CM, Boye E, Neufeld EJ. Female monozygotic twins discordant for hemophilia A due to nonrandom X-chromosome inactivation. *Am J Hematol* 2008 Oct; 83(10):778-80.

13. Valleix S, Vinciguerra C, Lavergne JM, et al. Skewed X-chromosome inactivation in monozygotic diamniotic twin sisters results in severe and mild hemophilia A. *Blood* 2002 Oct 15;100(8):3034-6.
14. Chuansumrit A, Sasanakul W, Goodeve A, et al. Inversion of intron 22 of the factor VIII gene in a girl with severe hemophilia A and Turner's syndrome. *Thromb Haemost* 1999 Oct; 82(4):1379.
15. Panarello C, Aquila M, Caprino D, et al. Concomitant Turner syndrome and hemophilia A in a female with an idic(X)(p11) heterozygous at locus DXS52. *Cytogenet Cell Genet* 1992;59(4):241-2.
16. Loreth RM, El-Maarri O, Schroder J, et al. Haemophilia A in a female caused by coincidence of a Swyer syndrome and a missense mutation in factor VIII gene. *Thromb Haemost* 2006 Apr; 95(4):747-8.
17. Andrejev NJ, Korenevskaya MI, Rutberg RA, et al. Haemophilia A in a patient with testicular feminization. *Thromb Diath Haemorrh* 1975 Apr 30; 33(2):208-16.
18. Pavlova A, Brondke H, Musebeck J, et al. Molecular mechanisms underlying haemophilia A phenotype in seven females. *J Thromb Haemost* 2009 Mar 19.
19. Barrowcliffe TW. Monitoring haemophilia severity and treatment: new or old laboratory tests? *Haemophilia* 2004 Oct;10 Suppl 4:109-14.
20. Sahud MA. Factor VIII inhibitors. Laboratory diagnosis of inhibitors. *Semin Thromb Hemost* 2000;26(2):195-203.
21. Dave BJ, Sanger WG. Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetic imbalances. *Semin Pediatr Neurol* 2007 Mar;14(1):2-6.
22. Shen BW, Spiegel PC, Chang C-H, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 2008 February 1, 2008;111(3):1240-7.
23. Ngo JCK, Huang M, Roth DA, et al. Crystal structure of human factor VIII: Implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure* 2008;16(4):597-606.
24. Macedo-Ribeiro S, Bode W, Huber R, et al. Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. *Nature* 1999;402(6760):434-9.
25. Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, et al. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* 1999;402(6760):439-42.
26. Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, et al. Evidence for a von Willebrand factor defect in factor VIII binding in three members of a family previously misdiagnosed mild haemophilia A and haemophilia A carriers: consequences for therapy and genetic counselling. *Br J Haematol* 1990 Nov;76(3):372-9.

27. Fernandez-Lopez O, Garcia-Lozano JR, Nunez-Vazquez R, et al. The spectrum of mutations in Southern Spanish patients with hemophilia A and identification of 28 novel mutations. *Haematologica* 2005 May 1, 2005;90(5):707-10.
28. Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, et al. Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modelling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia* 2005;11(5):481-91.
29. Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, et al. 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 August 1, 2000;96(3):958-65.
30. Liu M-L, Shen BW, Nakaya S, et al. Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure. *Blood* 2000 August 1, 2000;96(3):979-87.
31. Habart D, Kalabova D, Novotny M, et al. Thirty-four novel mutations detected in factor VIII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel amino acid substitutions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003;1(4):773-81.
32. Citron M, Godmilow L, Ganguly T, et al. High throughput mutation screening of the factor VIII gene (F8C) in hemophilia A: 37 novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Human Mutation* 2002;20(4):267-74.
33. Waseem NH, Bagnall R, Green PM, et al. Start of UK confidential haemophilia A database: Analysis of 142 patients by solid phase fluorescent chemical cleavage of mismatch. *Thromb Haemost* 1999;81(6):900-5.
34. Cutler JA, Mitchell MJ, Smith MP, et al. The identification and classification of 41 novel mutations in the factor VIII gene (F8C). *Hum Mutat* 2002;19(3):274-8.
35. Bogdanova N, Markoff A, Pollmann H, et al. Spectrum of molecular defects and mutation detection rate in patients with severe hemophilia A. *Hum Mutat* 2005;26(3):249-54.
36. Acquila M, Caprino D, Bicocchi P, et al. A skewed lyonization phenomenon as cause of hemophilia A in a female patient. *Blood* 1995 Jan 15;85(2):599-600.
37. Knobe KE, Sjorin E, Soller MJ, et al. Female haemophilia A: two unusual cases caused by skewed X inactivation. *Haemophilia* 2008 Jun 5.
38. Pieneman WC, Deutz-Terlouw PP, Reitsma PH, et al. Screening for mutations in haemophilia A patients by multiplex PCR-SSCP, Southern blotting and RNA analysis: the detection of a genetic abnormality in the factor VIII gene in 30 out of 35 patients. *Br J Haematol* 1995;90(2):442-9.