

The molecular diagnosis of the intron 22 inversion in haemophilia A

Andra Grigore (1), Mihaela Dragomir (2), Mihnea Găman (1), Melen Branza (2), Daniel Coriu (1,2)

1. Universitatea de Medicina si Farmacie Carol Davila

2. Institutul Clinic Fundeni

Background

Hemophilia A is an X-linked recessive bleeding disorder that affects 1 in 5000 males worldwide. It is caused by heterogenous mutations in the factor VIII gene, leading to various degrees of deficiency in FVIII clotting activity and consequently bleeding tendency. Factor VIII gene is located distal on the long arm of the X-chromosome, in a region predisposed to genomic rearrangements. It is one of largest genes described, having approximately 187 kb and containing 26 exons. Recurrent mutations are uncommon, excepting intron 22 and intron 1 inversions. Intron 22 inversion induced by intrachromosomal homologous recombination is the most frequent molecular defect, reported in nearly half cases of severe Hemophilia A. Due to the large dimensions of the Factor VIII gene and of the intron 22, the genetic analysis of the intron 22 inversion is challenging.

Aims

We aimed to implement the molecular diagnosis of intron 22 inversion for patients with severe Hemophilia A.

Methods

We set up a 3-step protocol for intron 22 inversion by means of inverse-shifting polymerase chain reaction (PCR), involving DNA restriction with BclI enzyme, self-ligation of restriction fragments, followed by multiplex PCR analysis. Using this protocol, we analyzed 46 DNA samples from patients with severe Hemophilia A.

Results

Intron 22 inversion was detected in 41.3% of patients, our results being in line with those previously reported in literature for other populations.

Conclusion

Using this protocol we were able to detect the presence of intron 22 inversion for the first time in Romanian patients with severe Hemophilia A. The molecular diagnosis in hemophilia A provides valuable information not only for genetic counseling and prenatal diagnosis, but also for patients' management, the presence of intron 22 inversion being associated with a significant risk for inhibitor development. Moreover, in the future, the identification of mutational status will be an essential step for gene therapy.

Diagnosticul molecular al inversiei intronului 22 în hemofilia A

Andra Grigore (1), Mihaela Dragomir (2), Mihnea Găman (1), Melen Branza (2), Daniel Coriu (1,2)

1. Universitatea de Medicina si Farmacie Carol Davila

2. Institutul Clinic Fundeni

Background

Hemofilia A reprezintă un sindrom hemoragic cu transmitere recesivă X-linkată, care afectează la nivel global 1 din 5000 de bărbați. Este determinată de mutații heterogene la nivelul genei care codifică factorul VIII de coagulare, având drept consecință deficitul în diverse grade al activității factorului VIII și manifestări hemoragice asociate. Gena care codifică factorul VIII este situată distal pe brațul lung al cromozomului X, într-o regiune predispusă la rearanjamente genomice. Este una dintre cele mai mari gene descrise, având aproximativ 187 kb și conține 26 exoni. Mutațiile recurente sunt rare, cu excepția inversiilor de intron 22 și intron 1. Inversia intronului 22 se produce prin recombinare intracromozomială omoloagă și reprezintă cel mai frecvent defect molecular, fiind raportată în aproape jumătate din cazurile de Hemofilie A severă. Analiza genetică a inversiei intronului 22 este dificilă deoarece atât gena care codifică FVIII, cât și intronul 22 au dimensiuni crescute.

Obiective

Ne-am propus să implementăm diagnosticul molecular al inversiei intronului 22 pentru pacienții cu formă severă de Hemofilie A.

Material și metodă

Am pus la punct un protocol în 3 pași pentru detecția inversiei intronului 22 prin reacție de polimerizare în lanț (PCR) de tip "inverse-shifting". Mai întâi am realizat restricția ADN cu ajutorul enzimei BclI, apoi ligarea fragmentelor de restricție, urmată de analiza multiplex PCR. Cu ajutorul acestui protocol, am analizat 46 probe de ADN de la pacienți cu Hemofilie A - formă severă.

Rezultate

Inversia intronului 22 a fost detectată la 41.3% din pacienții testați, rezultatele noastre fiind similare celor raportate în literatura pentru alte populații.

Concluzii

Folosind acest protocol, am putut detecta prezența inversiei intronului 22 pentru prima dată la pacienți români cu Hemofilie A - formă severă. Diagnosticul molecular al hemofiliei A oferă informații valoroase nu numai pentru consilierea genetică și diagnosticul prenatal, ci și pentru managementul pacienților, deoarece prezența inversiei intronului 22 este asociată cu un risc semnificativ pentru dezvoltarea de inhibitori. Mai mult, în viitor, identificarea statusului mutațional va reprezenta un pas esențial pentru terapia genică.