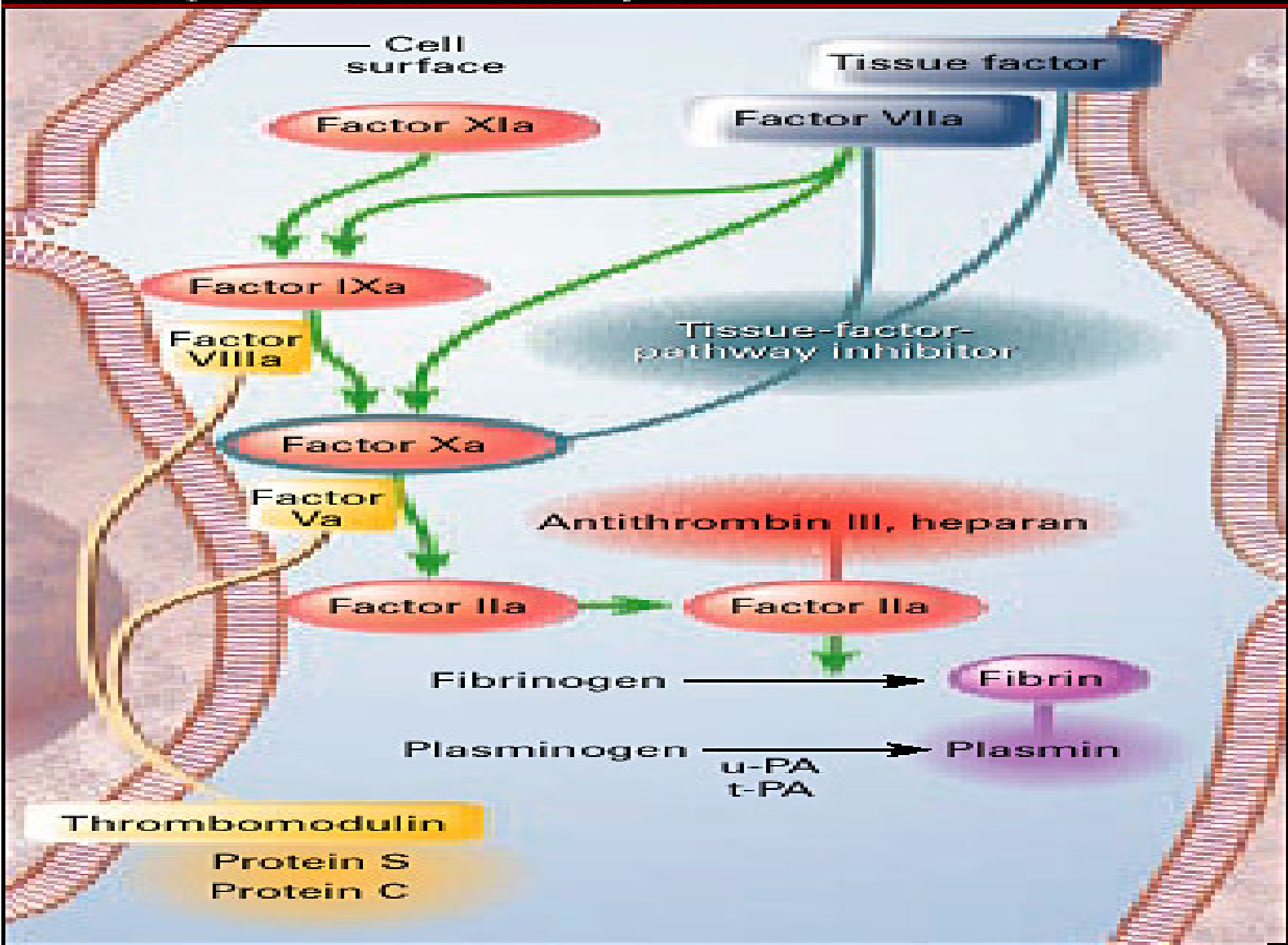




HEMOFİLİ A VE B

AHMET GENÇ

HEMOFİLİ A

- F VIII eksikliği ile karakterize,
- X'e bağlı kalıtım
- ~5000-10.000:1 erkekte
- Kas zedelenmesi, yaralarda uzun kanamalar ile karakterize edilir.

Hemofilinin Tarihi

- İlk kez M.S. II. yy da Rabbi Simon de Gamaliol tarafından sünnette 3 erkek kardeşin ölmesiyle tanımlanmıştır.
- Medikal literatürde ilk spesifik kanama bozukluğu 8. yy da cerrah Khalif ibn Abbasi,
- Hemofili terimi ilk Hopff tarafından 1828 de kullanıldı.
- 1979'da F VIII immünoaaffinite purifikasyonu ile vWF'den ayrıldı.

Hemofilinin Tarihi

- 1982 yılında Fass ve ark. monoklonal antikorları kullanarak F VIII'i izole ettiler.
- 1984 yılında aminoasit dizilimi çıkarıldı.

HEMOFİLİ A

- F VIII, F X'nun aktivasyonunda bir kofaktör olarak işlev görür. Reaksiyon fosfolipid ve F IXa tarafından katalizlenmektedir.
- F VIII aktivitesi;
 - % 1< ise ağır hemofili
 - % 1-10 ise orta hemofili
 - % 10-30 ise hafif hemofili

KLİNİK ÖZELLİKLERİ-1

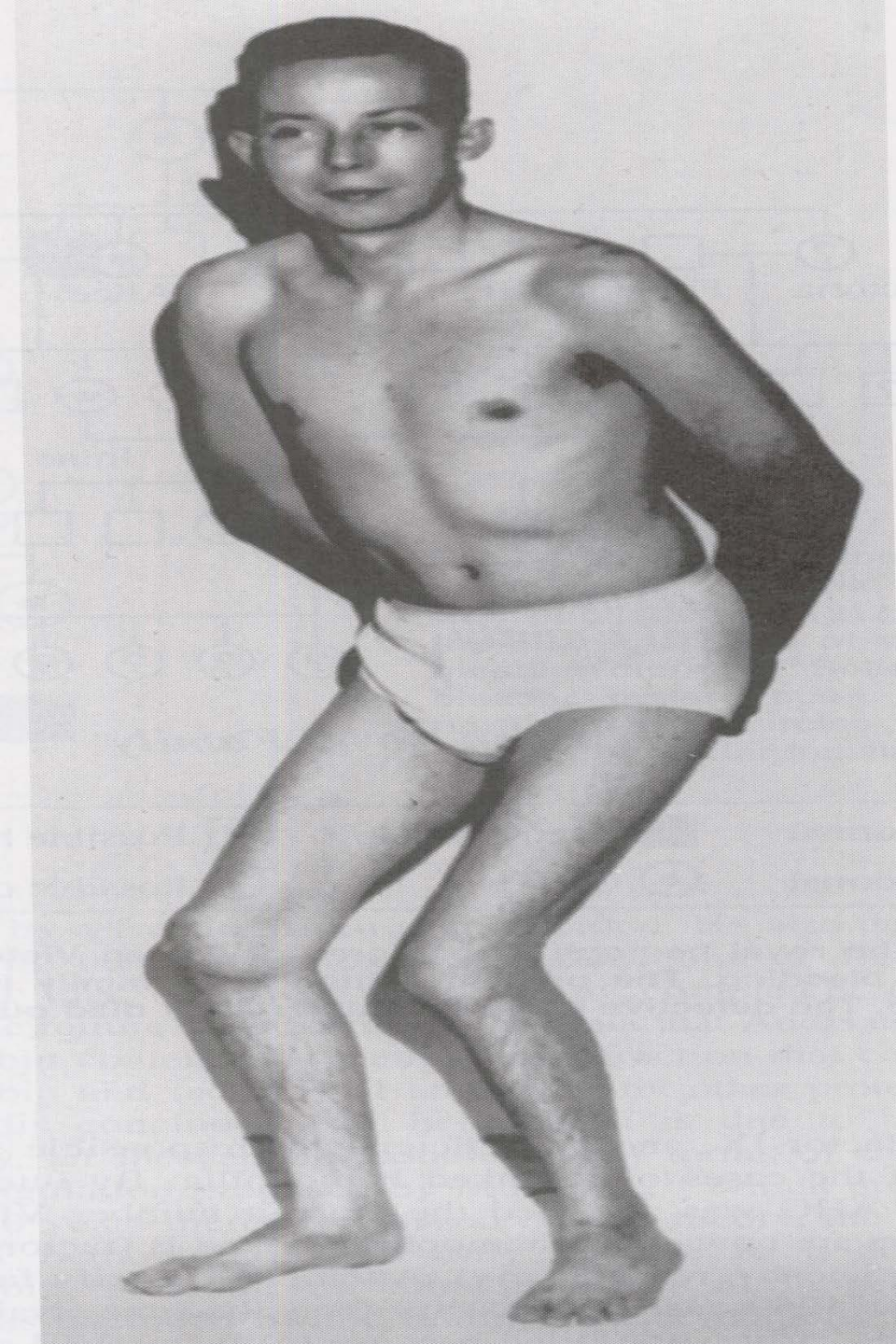
- F VIII eksikliğinde kanama sıklığı ve şiddeti F VIII düzeyine bağlıdır.
- Eklem, topuk, diz, kalça ve dirsekler kanama bölgeleridir ve herhangi bir yaralanma kanamaya neden olur.

KLİNİK ÖZELLİKLERİ-2

- Tedavi edilmezse;
 - İntrakapsüler kanama şiddetli ağrıya,
 - Eklem yerlerinde sertliğe,
 - İnflamasyona neden olur.
- Kondrositlerde demirin birikimi sonucunda;
 - Dejeneratif artrit,
 - Artikular şeklin bozukluğuna,
 - Kemik ve kıkırdak gelişimi zayıflamasına,
 - Sonuçta ankiloz olur.



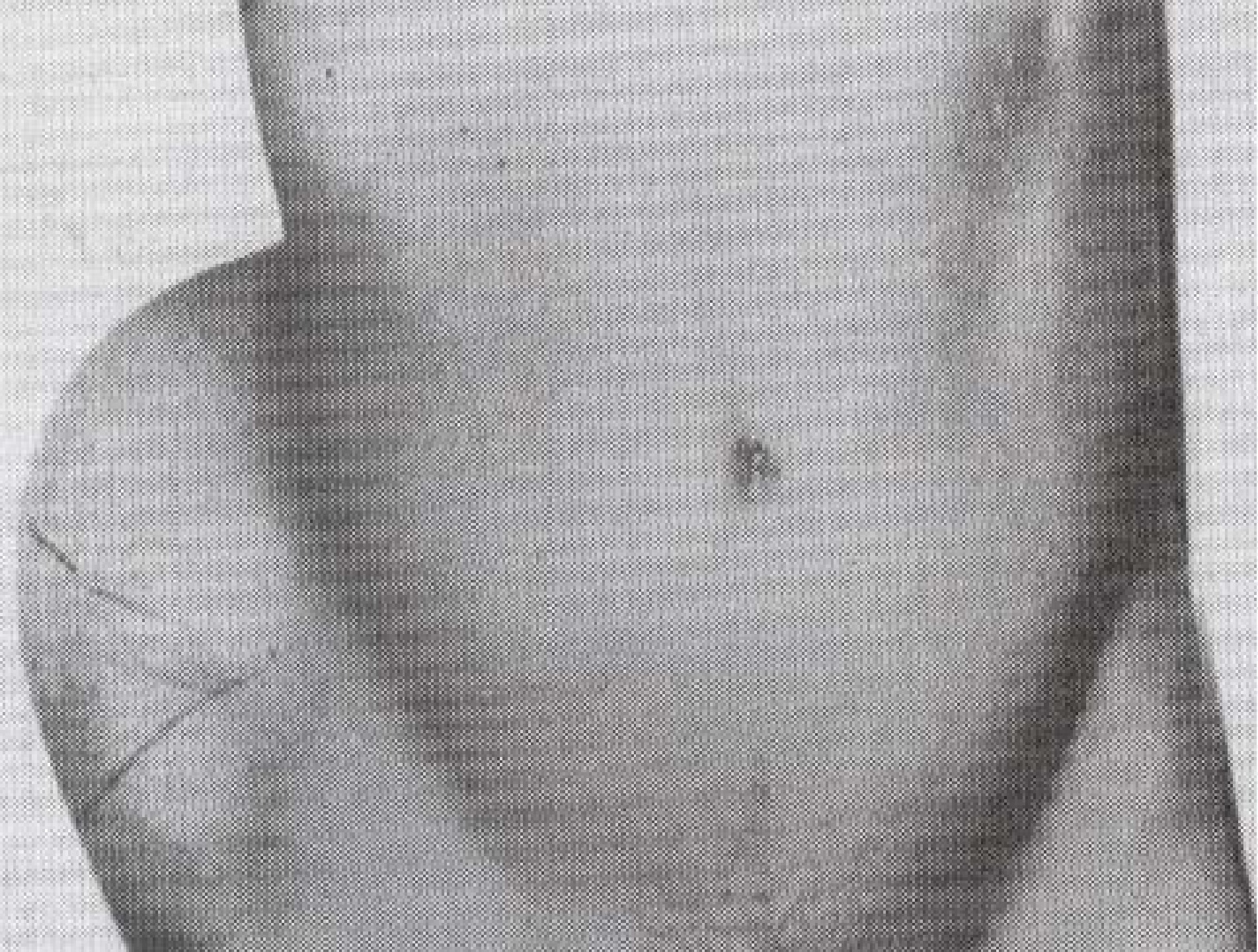
- Her iki diz ve ellerde
fleksiyon deformitesi



KLİNİK ÖZELLİKLERİ-3

- Uylukta, posterior abdominal duvarda ve baldırda kanamalar,
- Kas kanamaları,
- Nadiren hematuri,
- Nadiren MSS kanamaları,







F VIII GENİ

- Xq28
- 186 kb (X kr. ~ % 0.1)
- Normal F VIII mRNA'sı ~ 9 kb

F VIII A GENİ

- 8 kb
- Hücrelerin çoğunda transkripte edilir,
- Hiç ara dizilim içermemektedir,
- F VIII genine zıt yönde transkripte edilmekte,
- % 99.5'i tekrar eden dizilerden oluşmuştur.

F VIII B GENİ

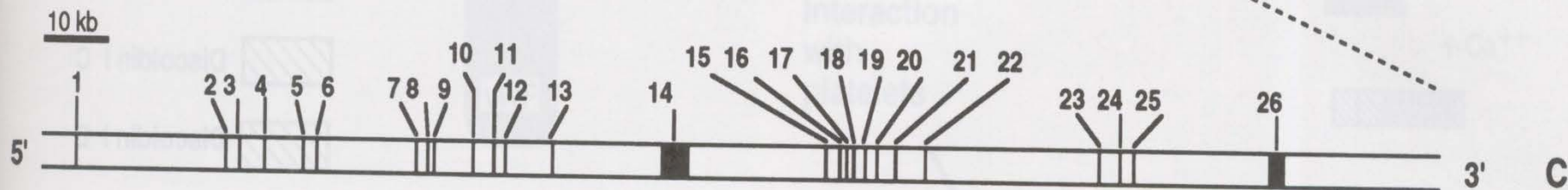
- 2.5 kb,
- F VIII genin 23 ila 26. eksonu kullanan 8 amino asit kodlamakta,
- F VIII geniyle aynı yönde transkripte olmakta,
- Bu iki transkriptin işlevi ve proteinlerin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir



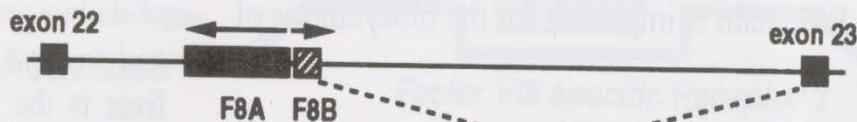
A



B



C



D

F VIII PROTEİNİN

- SENTEZLENDİĞİ YERLER;

- Haploositler,
- dalak,
- lenf nodları
- diğer dokuların çoğunda,

- SENTEZLENMEDİĞİ YERLER;

- Kİ,
- periferel,
- kan lenfositleri
- endotelyal hücreleri.

FVIII PROTEİNİ

- F VIII geninin prekürsör proteini 2351 amino asit rezidüsünden,
- İlk 19 amino asit sinyal peptidi,
- Aktif bir protein sinyal peptidin yarılmasıyla oluşur. Bu da 2332 amino asit içermektedir.
- 264.763 MA ya sahiptir.

F VIII PROTEİNİ

- Proteolizlere oldukça hassastır.
- F VIII'in yarılanma ömrü 12 saattir.
- Plazmada 100-200 ng/ml kadar bulunur.

A DOMAINLERİ

- İlk üçü A1 (aminoasit rezidüleri 1-329), A2 (380-711) ve A3 (rezidüleri 1649-2019) domainleridir.
- Bu domainlerin aminoasit dizilimleri % 30 oranında aynıdır.
- A1 domaini ekson 1-8'de kodlanmakta
 - C310'da bir Cu bağlamaktadır.

A DOMAINLERİ

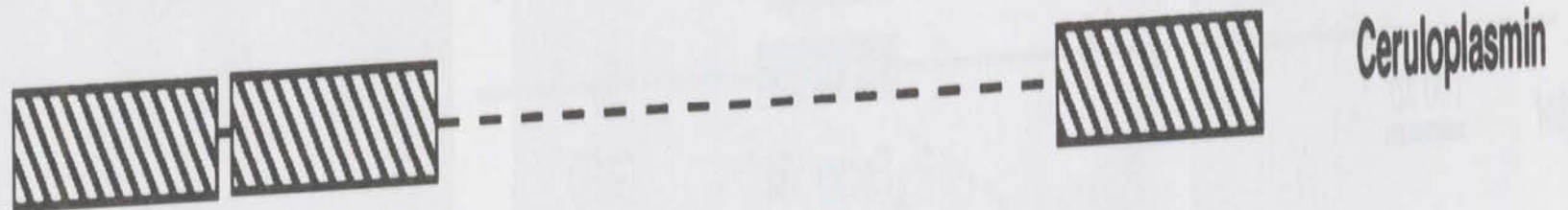
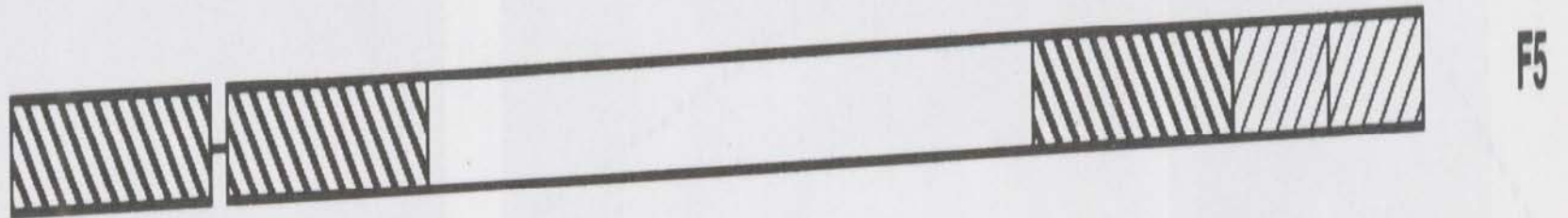
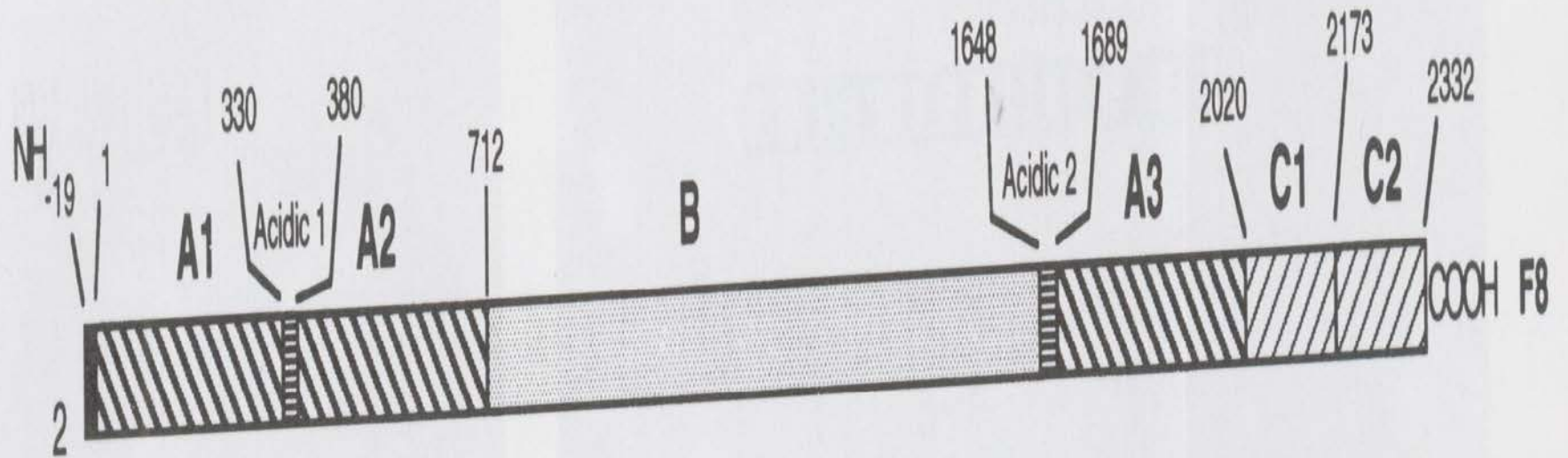
- A2 domaini ekson 9-13 ve 14. eksonun bir kısmında kodlanmakta,
 - Fonksiyonu hala bilinmemektedir.
 - A2 subünitenin delesyonu aktivitenin kaybolmasına neden olmaktadır.
- A3 domaini 14. eksonun bir kısmı ile ekson 15-18'de kodlanmaktadır.

B DOMAINİ

- B domainin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.
- Ekson 14'ün büyük bir kısmında kodlanmaktadır.

C DOMAINİ

- C1 domaini, 20-23. eksonlarda kodlanmakta ve 2020-2172 amino asit rezidüsü içermektedir.
- C2 domain, ekson 24-26'da kodlanmakta, 2173-2332 a.asit rezidüsü içermektedir.



milk fat globular
membrane protein
mouse



F VIII

- İntinsik yolda kritik bir öneme sahiptir.
- F IXa tarafından F X'nun aktivasyonu için gereklidir.
- F IXa, F VIIla, fosfolipid ve Ca^{2+} iyonları varlığında F Xa oluşturmak için F X'nun N' ucundan ~ 11 kDa kadar yarmaktadır.

F VIII'İN PROTEOLİTİK AKTİVASYONU

- F VIII fosfolipid yüzey varlığında F Xa veya trombin (F IIa) gibi proteazlar tarafından proteolitik yarıma ile aktive edilir.

- F VIII'in prokoagülant aktiviteleri için R372 veya R1689 bölünmesi önemlidir.
- R1689 bölünmesinde F VIII, vWF'den serbest kalmaktadır ve F VIII plateletler ile fosfolipidlerin etkileşimine izin vermektedir.

- Hemofili A hastalarında R372 ve R1689 da missense mutasyonları tanımlanmıştır.
 - *R372C* ve *R372H* mutasyonları birinci yarıılma bölgesinde,
 - *R1689C* ve *R1689H* ikinci yarıılma bölgesindeki mutasyonlarda sirkülasyondaki F VIII protein düzeyi normal ama aktivitesi düşük (%1-7) bulunmuştur.

B DOMAINİNİN SIRRI

- Proteolitik aktivasyon esnasında B domaini 740. ve 1648. aminoasit rezidülerinden yarılmaktadır.
- Bir deneyde B domainin 797-1652 aminoasit rezüdöleri ve 759-1639 rezüdölerinin delesyonu sonucunda normal kofaktör aktivite gözlenmiştir.

B DOMAININ SIRRI

- Ek olarak F VIII'de B domainsizlik trombin ile normal aktivite olmaktadır ve vWF ile normal etkileşmektedir.
- Yarılanma ömrü 13 saattir ki bu normal uzunluktaki cDNA tarafından kodlanan F VIII ile aynıdır.
- Muhtemelen F VIII'in sekresyonu ve/veya intrasellüler prosesleri düzenlediği düşünülmektedir.

FVIII'İN İNAKTİVASYONU-1

- F VIIIa'nın aktivitesi için 50 kDa A1, 43 kDa A2 ve 73 kDa A3 subünitelerinin heterotrimer polipeptitleri gerekmektedir.
- A1 subünitesi Cu iyonuna bağlı A3 subünitesi ile veya hafif zincirle birleşmiştir.
- A2 subünitesi, A1 subünitesine elektroforetik etkileşim ile bağlanmıştır.

F VIII'İN İNAKTİVASYONU-2

- Trombin ile aktive olduktan F VIII'in heterodimer yapısı F X ve fosfolipid tarafından stabile edilir.
- A2 subünitesinin A3 hafif zincirine bağ oluşturur.
- A2 subünitesinin bu bağlarının kopmasıyla F VIII inaktif olmaktadır.
- Fizyolojik olarak F VIII'in inaktivasyonu her zaman proteolitik olay gerektirmemesine rağmen, inaktivasyona proteolitik yarıma arabulucu olabilir.

F VIII'İN İNAKTİVASYONU-3

- Ayrıca aktif protein C de F VIII'i yarmakta ve inaktive etmektedir.
- FVIII de iki APC yarıлма alanı (R336/M337 ve R562/G563) tanımlanmıştır.

F VIII'İN vWF MOLEKÜLLÜ İLE ETKİLEŞİMİ

- vWF, plazmada F VIII'in normal stabilitesi için gereklidir.
- Ekstrasellüler sıvıda F VIII'e bağlanmaktadır.
- vWF eksikliği olan hastalarda vWF'nin infüzyonu F VIII düzeyini yükseltmektedir.

vWF

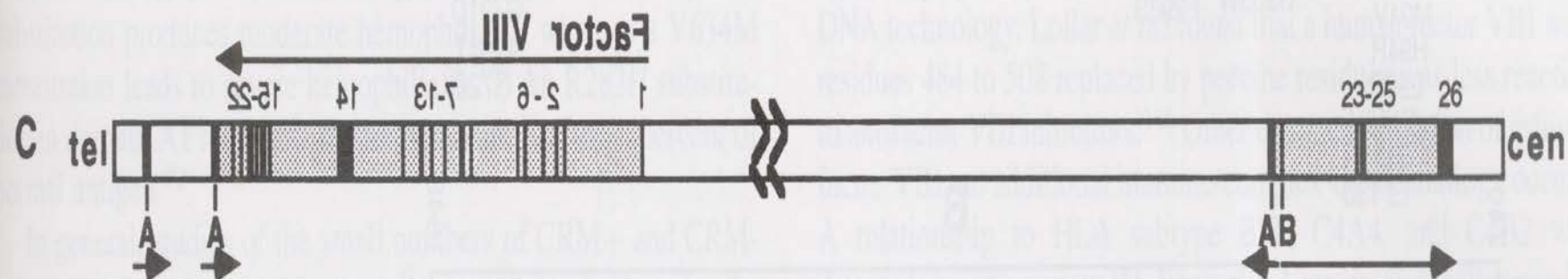
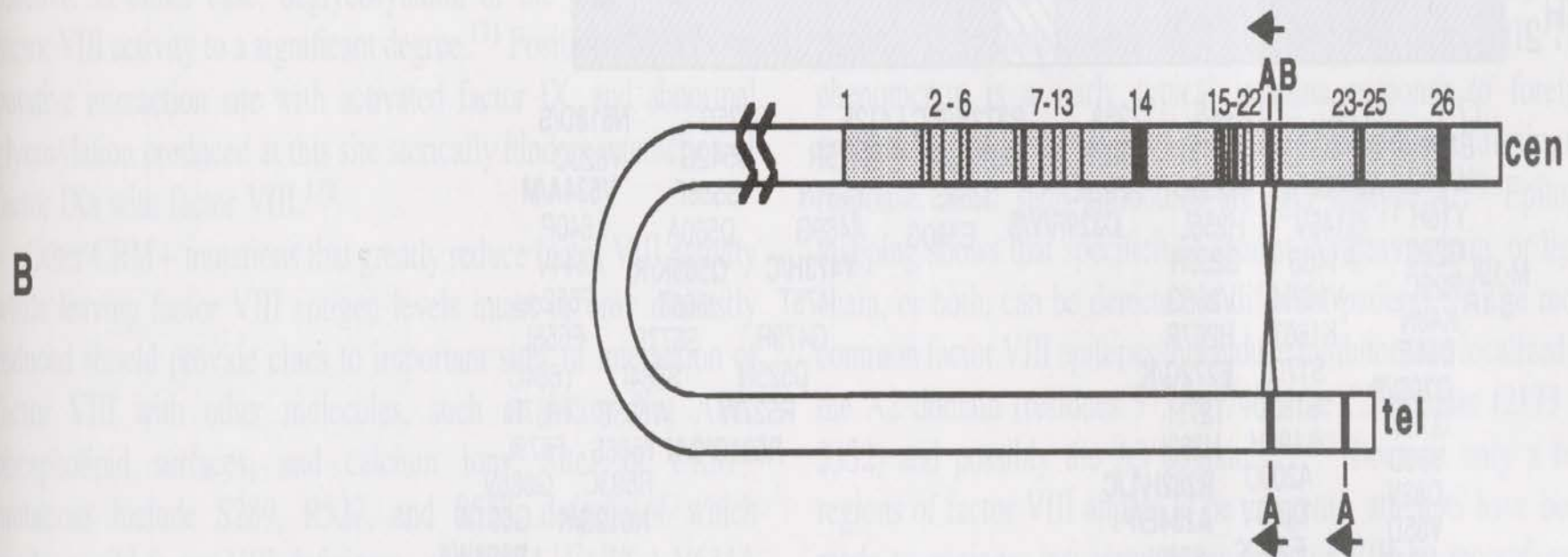
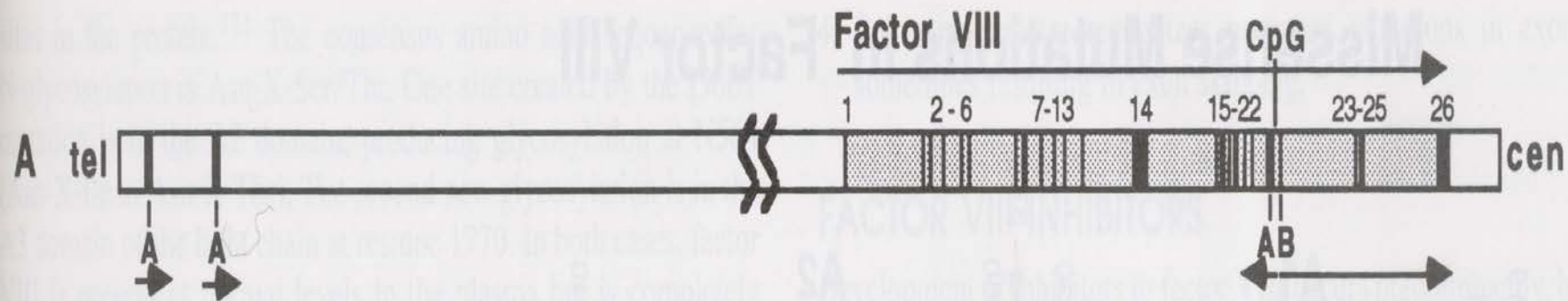
- F VIII aktivitesinin regülasyonunda
 - F VIII'in hafif ve ağır zincirlerinin birleşmesine ön ayak olmaktadır,
 - APC tarafından F VIII'in inaktivasyonundan korumak,
 - Trombin ile F VIII'in hafif zincirinin (A3 Domain) yarılmasını kolaylaştırma ve diğer trombin yarılmalarını engellemek,
 - Aktive olmuş plateletlere ve fosfolipidlere F VIII'in bağlanmasını engellemek

- F VIII'in hafif zincirinin N' ucunuN vWF ile etkileştiği gösterilmiştir. Bu da 15 aspartik asit ve glutamik asit içeren ikinci asidik bölgedir.
- F VIII'in aktivasyonu esnasında hafif zincir R1689 rezidüsünden trombin ile yarılır ve vWF F VIII'den ayrılır.
- F VIII'deki hafif zincirin asidik bölgesinin delesyonu normal F VIII ile kıyaslandığında normal spesifik aktivitenin olduğu ama vWF bağlanamadığı tespit edilmiştir.

- Ek olarak ikinci asidik bölgede Y1664 ve Y1680 sülfatlanmaktadır. Y1680F mutasyonu Y1680'nin sülfatlanmamasına ve vWF, F VIII'e yüksek affinite de bağlanmadığı tespit edilmiştir.
- Y1680'nin sülfatasyonu, F VIII'in vWF'e doğru bağlanması için gereken posttranslasyonel modifikasyon için önemlidir.

F VIII GEN İNVERSİYONU

- Ağır hemofili hastaların % 40'ının transkriptleri ekson 22-23 arasında kesintiye uğradığı tespit edilmiştir.
- Duplikasyona uğramış gen A'dan biri intron 22'ye diğerleri de aynı kromozonun 5' ucuna lokalize olmuştur.
- İntron 22'deki gen A ile X kromozonun 5' ucundaki bir gen A arasında inversiyon oluşmakta,
- Bu inversiyon ekson 1-22'yi ekson 23-26'dan 400 kb uzağına ve ters yönde yerleştirmektedir.



F VIII GEN İNVERSİYONU

- Bu mutasyonlar X kromozomuna özgüdür ve “flip tip” mutasyonu olarak adlandırılmıştır.
- Ekstragenik gen A kopyasına bağlı olarak,
 - Tip 1 distal gen A,
 - Tip 2 proksimal gen A,
 - Tip 3 ise nadiren 3 ekstragenik gen A kopyasına sahip bireylerdeki inversiyonlar.

F VIII GEN DELESYONLARI

- Hastaların $\sim$ % 5'i büyük delesyon taşımaktadır.
- Delesyonlar, genellikle hiç F VIII aktivitesi olmayan ağır hemifili A'ya neden olmaktadır.
 - 156 bç (ekson 22)
 - 294 bç (ekson 23-24) delesyonlar hafif tip hemofili A'ya neden olmaktadır.
- Ayrıca büyük delesyonlar inhibitör oluşumuna neden olmaktadır.

- **ÇERÇEVE KAYMASI MUTASYONLARI;**

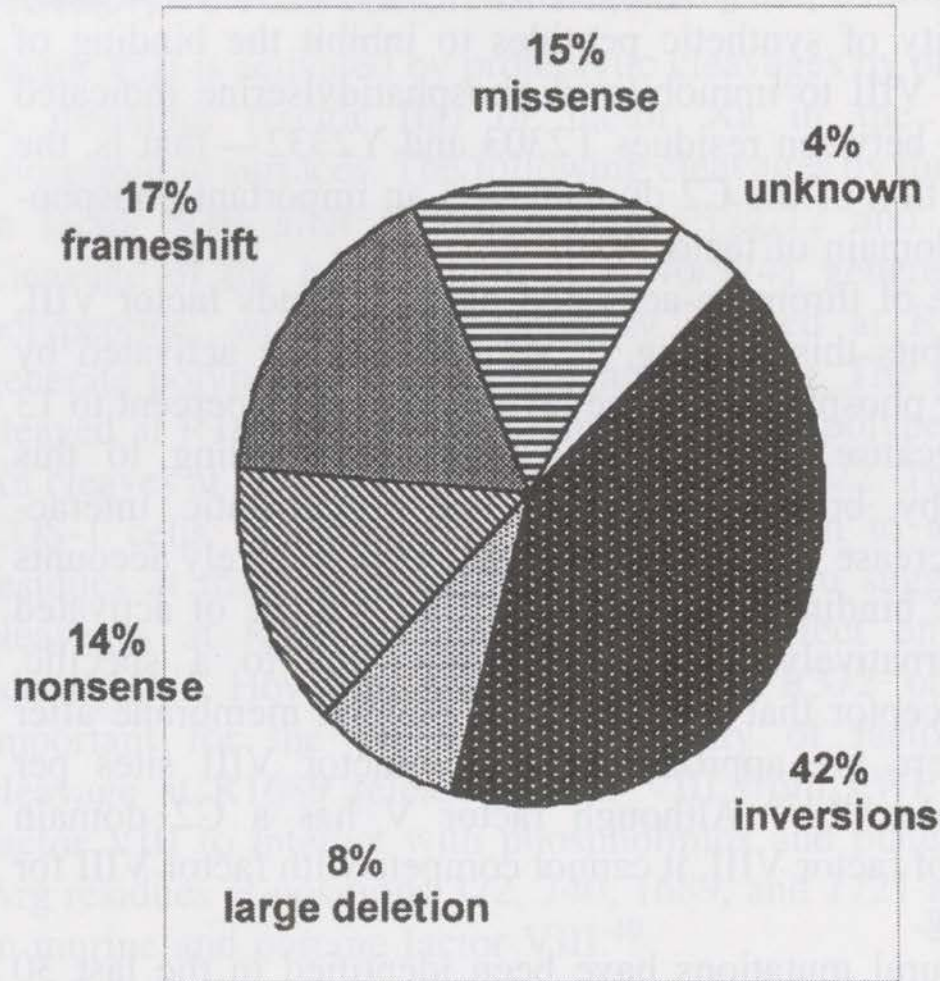
- Bütün çerçeve kayması mutasyonları ağır hemofili A'ya neden olduğu kabul edilmesine rağmen, ekson 14'te 1 nt delesyonu orta şiddetli hemofili A'ya (F VIII aktivitesi % 2) neden olmaktadır.

- **NONSENSE MUTASYONLARI;**

- Hastalıkta bilinen nokta mutasyonlarının $\sim$ % 20'sini oluşturmaktadır.
- Ağır hemofili A hastaların % 14'ünü oluşturmaktadır

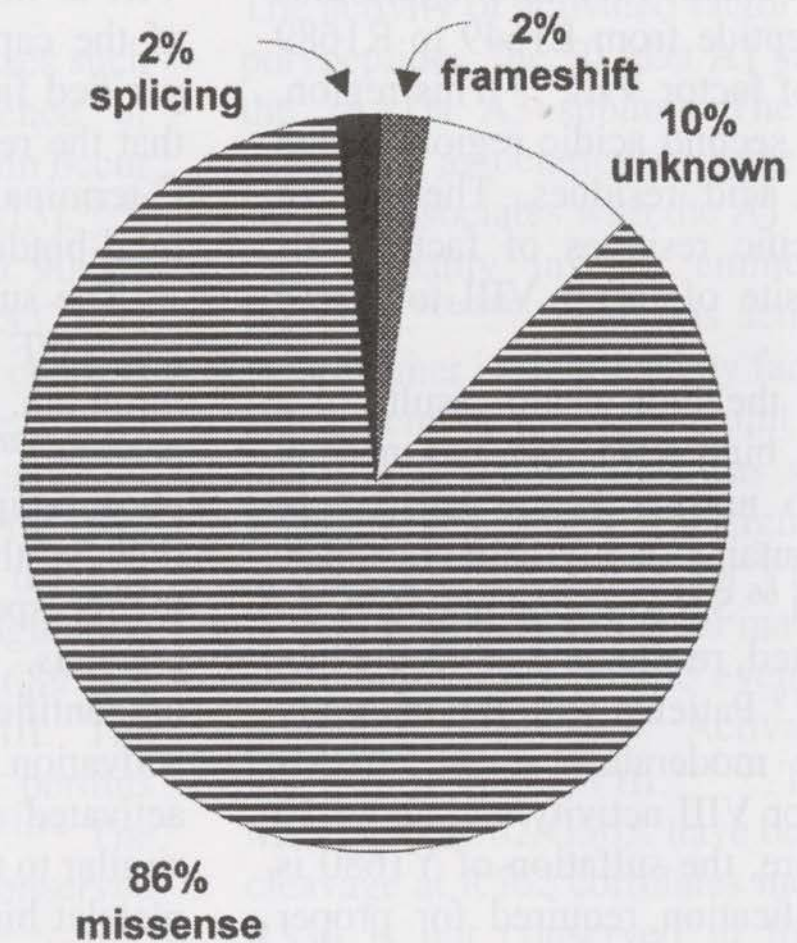
Factor VIII gene defects

Severe hemophilia A



52 patients

Mild -Moderate hemophilia A

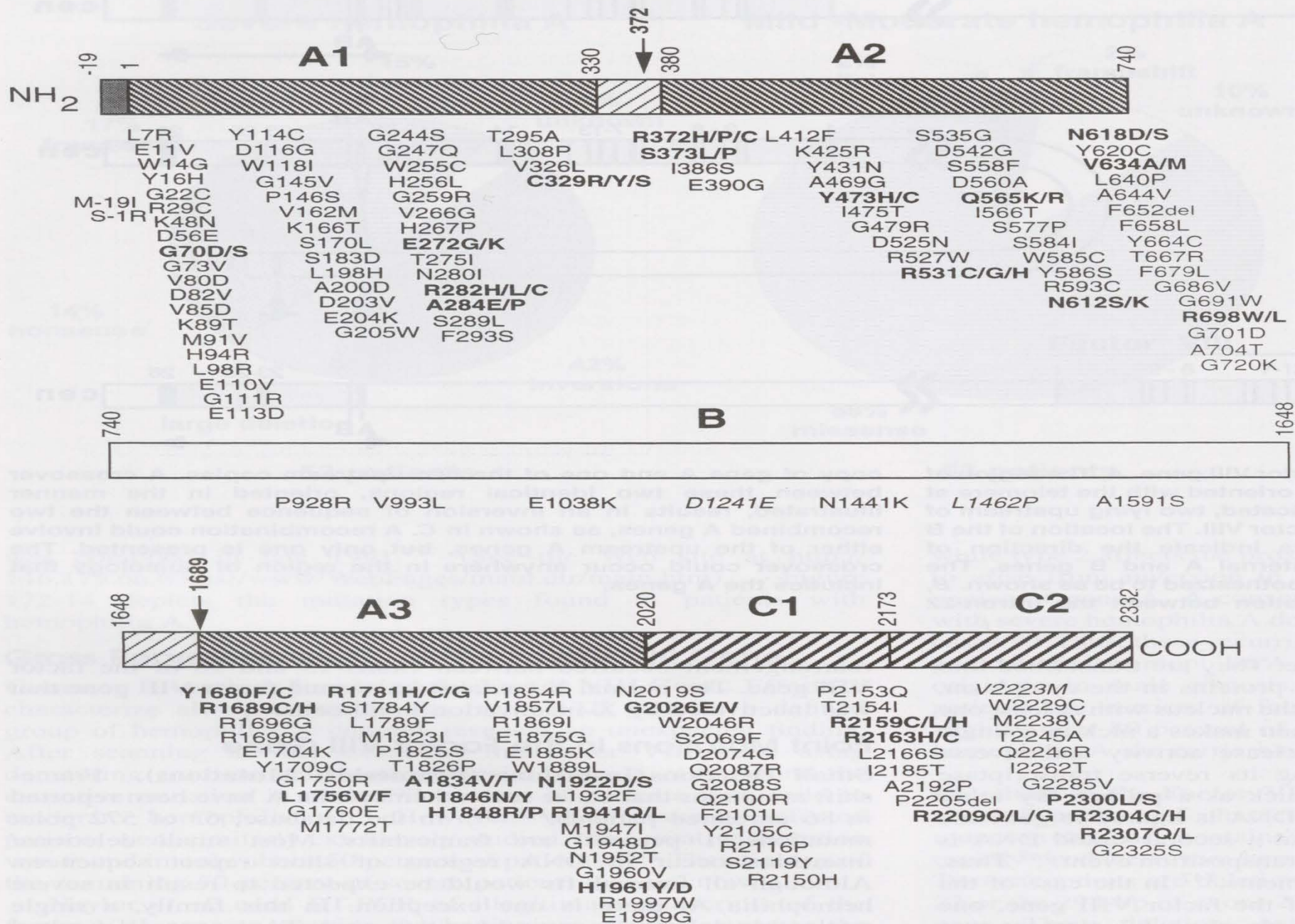


53 patients

F VIII GENİNDEKİ NOKTA MUTASYONLARI

- Missense mutasyonları;
 - Çoğu plazmada düşük F VIII düzeyi üretilmesine neden olmakla birlikte bunların mekanizması tam olarak bilinmemekte ve incelenmesi de çok güçtür.
 - Örneğin Trombinin yarma alanındaki (R372 ve R1689) mutasyon trombin tarafından FVIII aktivasyonunun bloke olduğu bilinmektedir.

Missense Mutations in Factor VIII



F VIII İNHİBİTÖRLERİ-1

- Fenomen yabancı proteinlere tipik immün yanıttır (ör, IgG subünit 4).
- F VIII'e inhibitör gelişimi yaygın olarak meydana gelmektedir. Bu sadece ağır hemofili A hastaların F VIII ile tedavilerinden sonra olmamaktadır.

FVIII İNHİBİTÖRLERİ-2

- F VIII inversiyonlarının ~ % 20'si inhibitör geliştirmektedir.
- Delesyonlar veya nonsense mutasyonu olan bireylerde inhibitör gelişimi de görülmüştür.
- Ayrıca hafif hemofili A hastalarında missense mutasyonları sonucunda da inhibitör gelişmesi görülmekle birlikte inhibitörlerin insidansı çok düşüktür.

TÜRKİYE'DEKİ ÇALIŞMLAR

- Türkiye'nin çeşitli polikliniklerinden toplanmış 141 hemofili A hastada;
 - 41 hastada inversiyon saptanmış,
 - **32'si distal inversiyon**
 - **9'u proksimal inversiyon**
 - Tüm hastaların % 29'u inversiyon mutasyonunu taşıdığı tespit edilmiştir.

TÜRKİYE'DEKİ ÇALIŞMALAR

Hemofili Tipi	Hasta Sayısı
Ağır	24
Orta	15
Hafif	16
Toplam	55

TÜRKİYE'DEKİ ÇALIŞMALAR

- 20 nokta mutasyonu*
 - 3 nonsense,
 - 15 missense
 - Bir yapışma yapışma bozukluğu,
 - Bir T delesyonu (stop kodonu oluşturmakta).
- Bir 8 bç insersiyon (ekson 4)*
- Bir büyük delesyon (2.8 kb <, ekson 14)*

Contact Activation

XI → **XIa**

IX

Ca^{2+}

IXa

$\text{Ca}^{2+} + \text{PL}$

$\text{Ca}^{2+} + \text{PL}$
VIIIa

X

$\text{Ca}^{2+} + \text{PL}$

Xa

Va

$\text{Ca}^{2+} + \text{PL}$

Prothrombin

Thrombin

XIII

Ca^{2+}

XIIIa

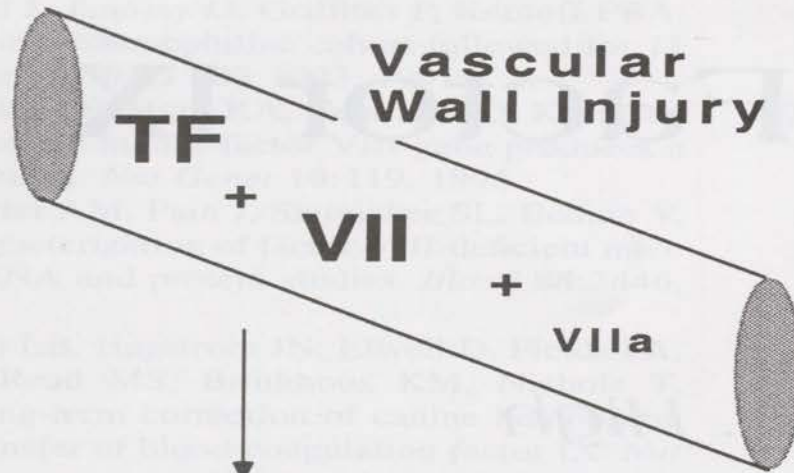
Fibrinogen

Ca^{2+}

Fibrin

Ca^{2+}

Stable Fibrin Clot



Tissue Factor / Factor VIIa

$\text{Ca}^{2+} + \text{PL}$

Va

$\text{Ca}^{2+} + \text{PL}$

Prothrombin

Thrombin

XIII

Ca^{2+}

XIIIa

Fibrinogen

Ca^{2+}

Fibrin

Ca^{2+}

Stable Fibrin Clot

HEMOFİLİ B

- F IX eksikliği (hemofili B veya Christmas hastalığı) fenotip olarak F VIII eksikliğiyle birçok ortak özelliği vardır.
- Klinik olarak;
 - Ağır hemofili B (F IX düzeyi % 1 <)
 - Orta hemofili B (F IX düzeyi % 1-5)
 - Hafif hemofili B (F IX düzeyi % 6-30)
- Hastalığın major semptomları eklemlerde ve yumuşak dokularda spontan kanamalardır. Diğer bölgelerde kanamalar daha azdır.

KLİNİK BULGULARI

- Hemofili B'nin frekansı $\sim 30.000:1$ 'dir.
- Klinik olarak hemofili A'dan ayrılmaktadır.
- Hematom
- Hemartroz
- Periferik sinir kanamaları
- MSS ve intraspinal kanamalar
- Hematüri

F IX GENİ

- Xq26.3-q27.1
- F IX geni 34 kb uzunluğundadır.
- F IX geni 25-1935 nt arasında değişen 8 ekson
- Özellikle protein C, FVII ve FX gibi vit K'ya bağlı protein grubuyla homoloji göstermektedir.

F IX PROTEİNİ

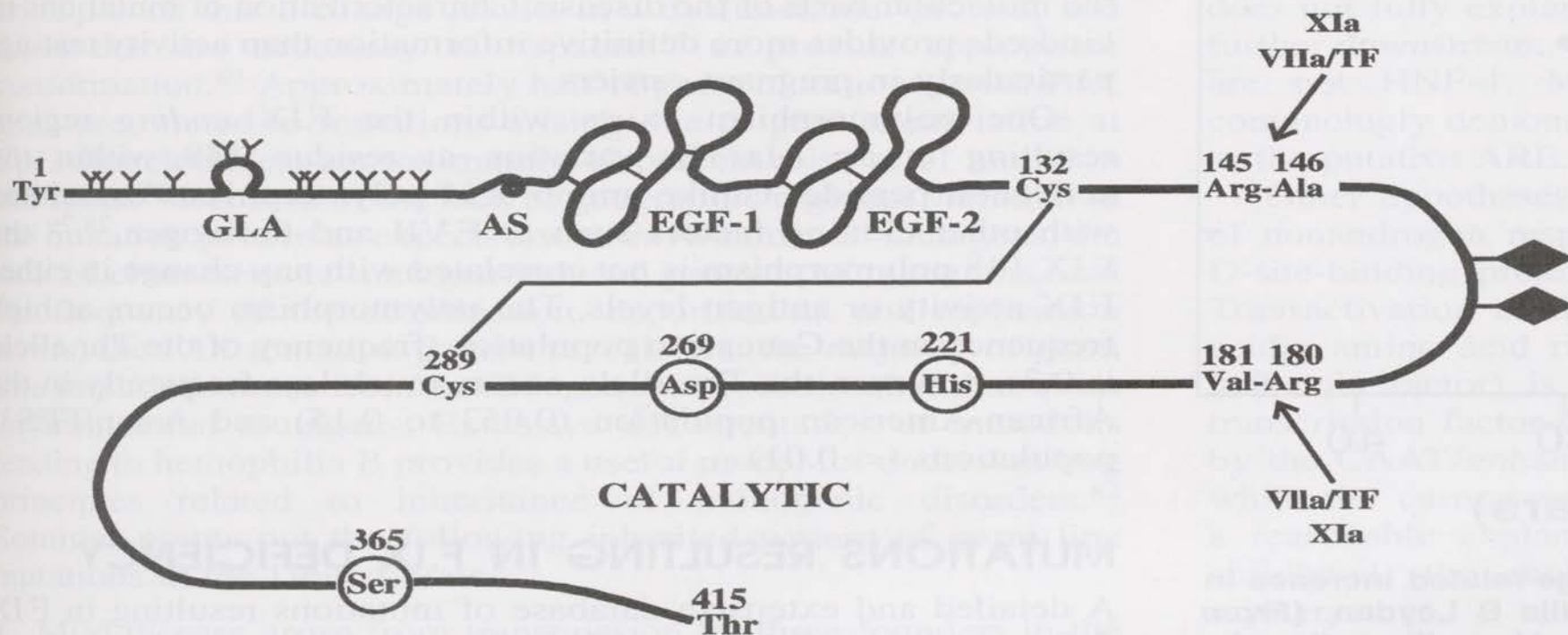
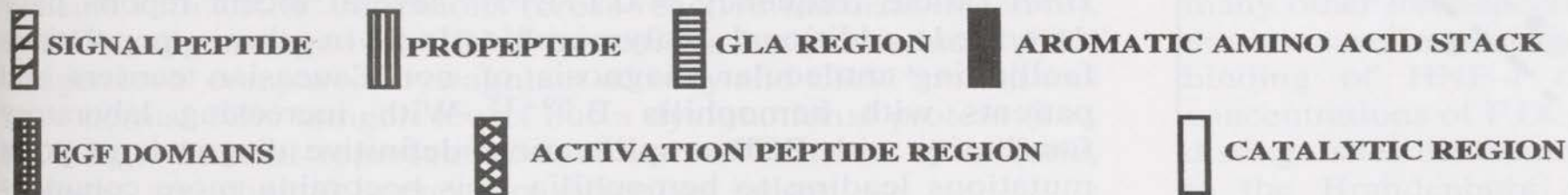
- İntrinsik koagülasyon faktörüdür,
- mRNA 3 kb,
- F IX'un prekösörü ~454 amino asit olarak KC de sentezlenir.
- Olgun F IX protein, proteolitik olarak 18 amino asitin sinyal peptidinden yarılmalarıyla oluşmaktadır.

FIX'UN YAPISI

- Propeptit bölgesi (-39 ie 01 rezidüleri)
- Gla domain (1-40 rezidüleri)
- Kısa aromatik bölge (41-46 rezidüleri)
- 2 EGF bölgesi (EGF1 47-84, EGF2 85-127 rezidüleri)
- Aktif peptid bölgesi (146-180 rezidüleri)
- Katalitik bölge (181-415 rezidüleri)

FIX'UN POSTTRANSLASYONAL MODİFİKASYONLARI

- Tirozin sülfasyonu (Try 155)
- Serin fosforilasyonu (Ser 158)
- O-glikolizasyonu (Thr 159, Thr 169, Thr 172)
- N-glikolizasyon (Asn 157, Asn 167)



F IX'UN YAPISI

- Bu iki bağıın yarılmasıyla 35 amino asitten ibaret aktif peptid,
 - Cys 132 ve Cys 289 arasında disülfid bağı taşıyan hafif zincir (1-145 a.asit),
 - Ağır zincir (181-415 a.asit).
- 380 a.asit taşıyan aktif F IX (F IXa) 45 kDa'dır.

Factor IX Activity (%)

50

40

30

20

10

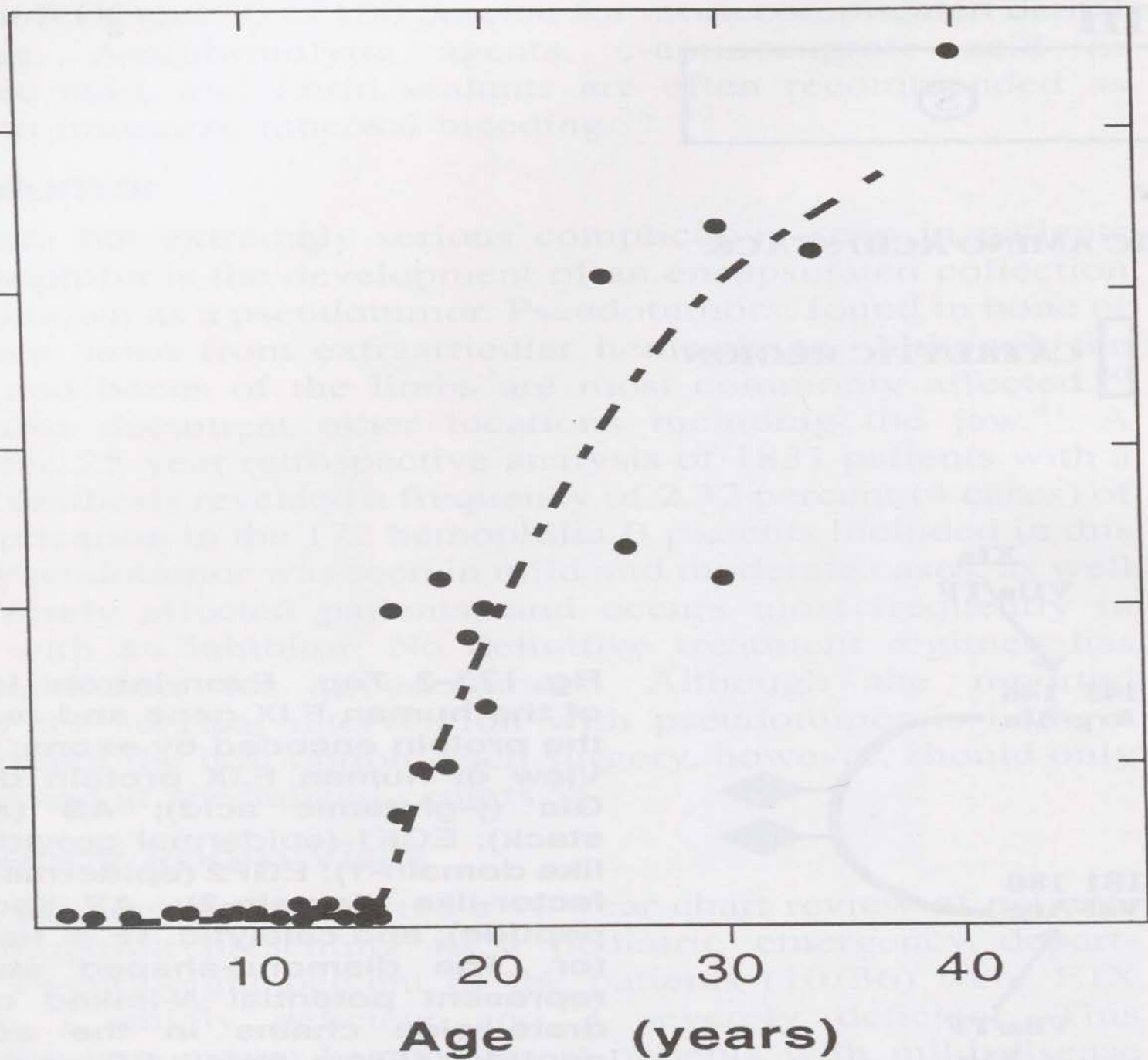
10

20

30

40

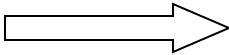
Age (years)



GLA DOMAINİ

- Oldukça negatif yüklüdür,
- Ca^{+2} bağlamaktadır,
- F IXa tarafından F VIIa'nın bağlanması açısından önemlidir.
- Gla domainin de oluşacak mutasyonlar;
 - 6-9. rezidüler posfolipidlerle etkileşimi
 - 9-13 rezidüleri γ karboksilasyonu,
 - 11 ve 12. rezidüler FVIIa-TF kompleksinin aktivasyonu etkileyecektir.

AKTİF PEPTİD

- Ca^{+2} iyonları varlığında F X_{1a} ile veya F VIII_a-TF- Ca^{2+} varlığında bu doman yarılmaktadır.
- Propeptid bölgesinde oluşan mutasyonlar Ca içeren konformasyonun destabilizasyonu sonucunda FIX aktivitesinin düşmesine  ağır hemofili.

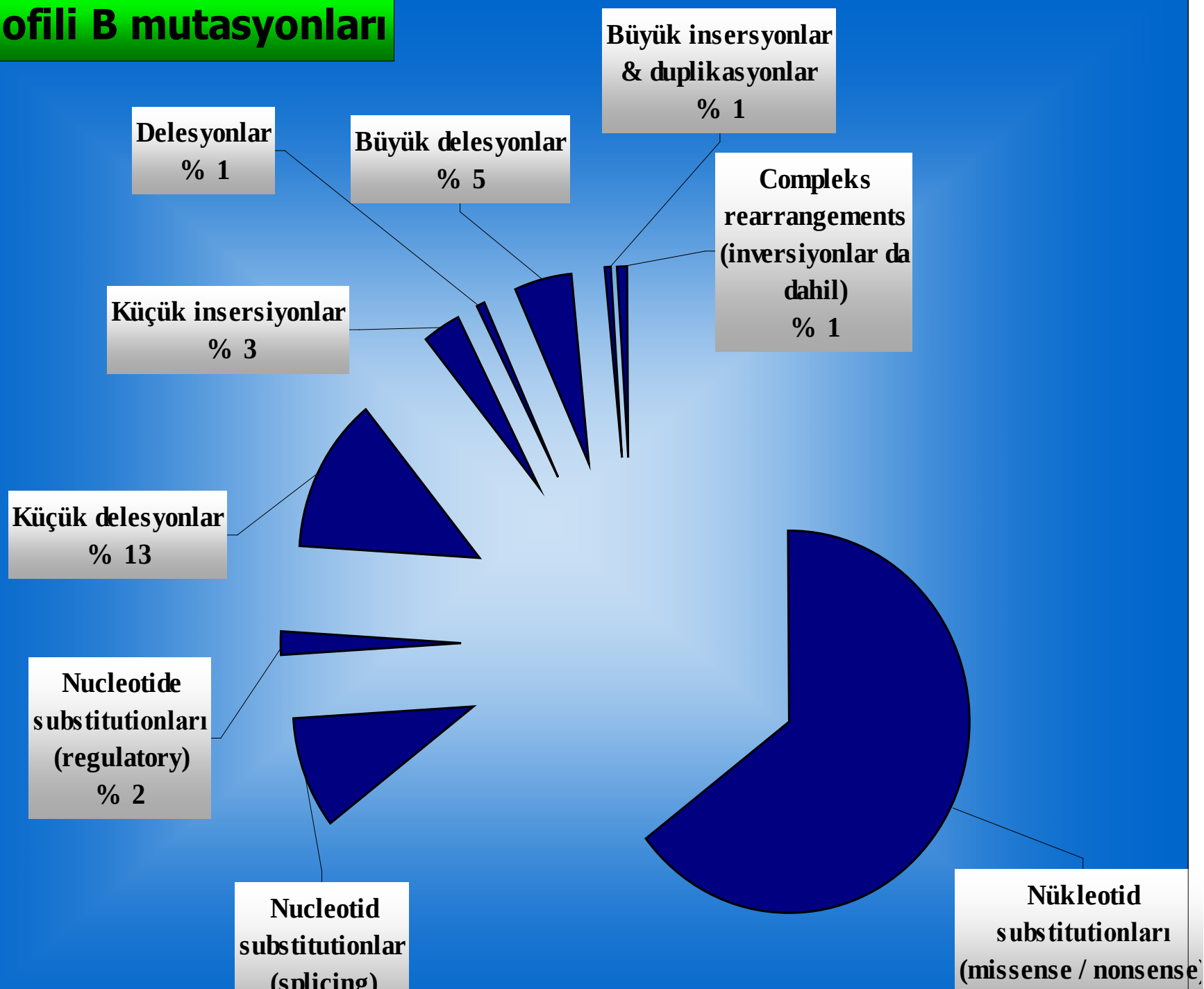
EGF DOMAINLARI

- Gla ve katalitik domainleri arasındaki EGF, Ca^{2+} bağlayıcı modülü olarak işlev görür,
- 47-84 rezidüleri (EGF1) ve 85-127 rezidülerinden (EGF2) oluşmuştur.
- EGF2 de mutasyon saptanmış ama EGF2'nin rolü tam olarak bilinmemektedir. F VIIa ve F X varlığında plateletlere yüksek affinite de önemli olduğu düşünülmektedir.

KATALİTİK BÖLGE

- Enzimatik serin proteaz etkisi vardır.
- Fosfolipid, F VIIIa ve Ca^{+2} varlığında F X'nun aktivasyonu için gereklidir.
- Gerekli konformasyonel elementleri ya da iyonik yükleri değiştirerek işlevsel FIX proteini değişmektedir.

Hemofili B mutasyonları



TÜRKİYE'DE YAPILAN ÇALIŞMALAR

- 41 yeni nokta mutasyonu
- 2 bç insersiyon
- Bir büyük delesyon tespit edilmiştir.

Teşekkürler...