

ДНК-диагностика гемофилии А с использованием новой медицинской технологии «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*» в группе больных из Российской Федерации

Бескоровайная Т.С., Миловидова Т.Б., Шагина О.А., Поляков А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»,
Москва, 115478, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

В работе представлены результаты поиска наиболее частой мутации гена *F8* — инверсии интрона 22 в 73 неродственных семьях, направленных в лабораторию ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» для диагностики гемофилии. Для этого использовалась внедренная в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» новая медицинская технология «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*». Установлено, что использование данной технологии делает более эффективным медико-генетическое консультирование отягощенных семей, позволяет с наименьшими временными и материально-техническими затратами провести ДНК-диагностику гемофилии А, в том числе диагностику носительства у родственников пробанда и пренатальную диагностику в отягощенных семьях.

Ключевые слова: гемофилия, прямая ДНК-диагностика, инверсия интрона 22, инвертированная ПЦР

Введение

Гемофилии — это группа генетически обусловленных заболеваний, вызванных нарушением свертываемости крови вследствие дефекта или отсутствия некоторых факторов коагуляции. Различают несколько форм гемофилий: гемофилия А связана с мутацией гена *F8*, кодирующего фактор свертывания крови VIII; гемофилия В — с мутацией гена *F9*, кодирующего фактор свертывания крови IX; гемофилия С — с мутацией гена *F11*, кодирующего фактор свертывания крови XI.

Наиболее частой формой болезни является гемофилия А, распространенность которой составляет 1:5000 новорожденных мальчиков [1–3]. Ген *F8*, ответственный за данную форму гемофилии, локализован на X-хромосоме в локусе Xq28, мутации наследуются по X-сцепленному рецессивному типу. В мире описана одна частая мутация гена *F8* — инверсия интрона 22, на долю которой приходится 30–50% всех мутаций этого гена у больных с тяжелой формой течения заболевания [4].

В интроне 22 гена фактора VIII находится участок размером 9,5 тыс. нуклеотидов, который имеет еще две почти точные копии, ориентированные в обратном направлении и расположенные на расстоянии 300–400 тыс. нуклеотидов от начала гена. При пространственном сближении этого внутригенного участка с одной из своих внегенных копий происходит их взаимодействие, которое приводит к тому, что ограниченная ими область гена, содержащая экзоны с 1-го по 22-й, меняет свою ориентацию. В результате инверсии меняется последовательность расположения экзонов гена *F8* на хромосоме: от 22 к 1 и далее с 23 по 26 экзоны. Таким образом, вместо полноразмерного фактора свертывания VIII,

циркулирующего в кровеносной системе, образуется короткий протеин, который не выходит из клеток и не может выполнять свою функцию. Инверсию невозможно выявить рутинными методами ДНК-диагностики, в том числе секвенированием, так как нуклеотидная последовательность экзонов при этой мутации остается неизменной [5, 6] (рис. 1).

Для детекции инверсии применяются методы Long-Range (полимеразная цепная реакция, ПЦР) или Саузерн-блоттинг, позволяющие визуализировать длинные участки ДНК и выявить разницу длин фрагмента, содержащего инверсию и нормального фрагмента гена *F8* [7]. Данные методы являются дорогостоящими и трудоемкими, поэтому в 2005 г. был предложен метод детектирования инверсии с использованием инвертированной ПЦР (Inverse Shifting-PCR) [7, 8]. Метод основан на том, что в последовательностях нормального и химерного гена *F8* имеются сайты узнавания эндонуклеазой рестрикции BclI. При обработке данной рестриктазой последовательности, содержащей нормальный ген, получается фрагмент длиной 21,5 т.п.н., содержащий химерный ген — фрагмент длиной 20 т.п.н. Фрагмент химерного гена, полученный при комбинации с внегенной копией гомолога интрона 22, содержит сайт узнавания рестриктазы, который отсутствует в нормальной последовательности гена *F8*. После обработки геномной ДНК рестрицирующей эндонуклеазой BclI, получившиеся липкие концы фрагментов сшиваются в кольца лигазой T4. Таким образом, происходит сближение интересующих участков гена, с которых далее проводится полимеразная цепная реакция, для которой используют трехпраймерную систему, включающую в себя праймеры:

1) гомологичный участку рядом с первым сайтом узнавания рестриктазой BclI и содержащийся и в нормальном, и в химерном участке гена (ГВ: внутригенный верхний);

2) гомологичный участку нормального гена *F8* рядом со вторым сайтом узнавания рестриктазой (ГН: внутригенный нижний);

3) гомологичный участку химерного гена рядом со вторым сайтом узнавания BclI (НН: внегенный нижний).

В геномной ДНК расстояние между верхним и нижними праймерами более 20 т.п.н. и они направлены в противоположенные стороны, поэтому амплификации с них не происходит. После сшивания фрагмента в кольцо, взаимная направленность праймеров изменяется и они пространственно сближаются. Благодаря этому удается получить продукт амплификации с пары праймеров ГВ и ГН при нормальной последовательности гена

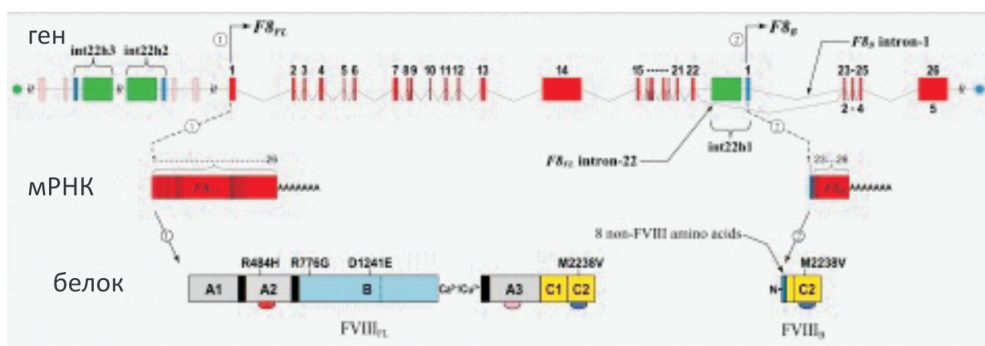
F8 или ГВ и НН — при инверсии интрона 22. Разница длин продуктов амплификации нормального и инвертированного гена позволяет различить их на электрофоре-зе (рис. 2).

Высокая частота заболевания, высокий генетический риск в отягощенных семьях и наличие мажорной мутации делает актуальной задачей разработку диагностической системы для рутинного поиска инверсии интрона 22 гена *F8* в гомо- и гетерозиготном состоянии.

Материалы и методы

Из архива лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» были отобраны семьи с направительным диагнозом «гемофилия». Все семьи обращались за проведением косвенной диагностики носительства гемофилии либо косвенной пренатальной диагностики с 2005 по 2015 гг. Образцы ДНК членов 73 семей оказались при-

А Ген и белок F8 в норме



Б Ген и белок F8 с инверсией интрона 22

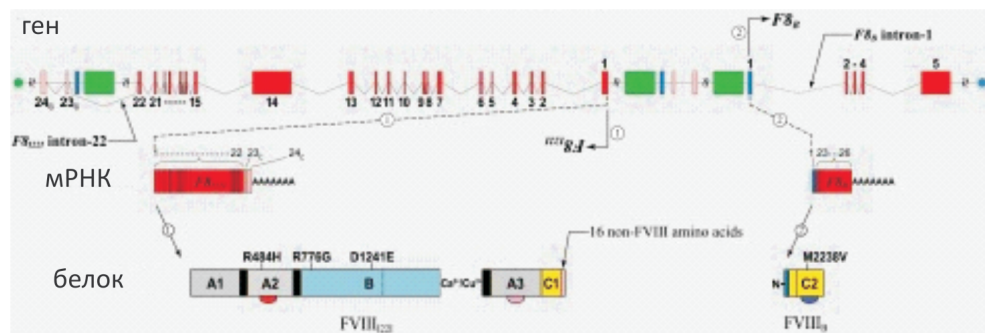


Рис. 1. Структура и функционирование гена *F8* в норме и при инверсии интрона 22 (по Sauna Z.E., Lozier J.N., Kasper C.K. et al. с изменениями [6]).
А. Ген *F8* в норме имеет две полиаденилированные транскрипционные единицы. Транскрипт *F8_{FL}* содержит всю последовательность гена — экзоны 1—26 (9030 нуклеотидов) и кодирует полноразмерный белок *FVIII_{FL}* длиной 2332 аминокислот, циркулирующий в крови и регулирующий свертывание. Транскрипт *F8_B* содержит 2598 нуклеотидов, включая 169 нуклеотидов первого экзона, отсутствующих в белке *FVIII_{FL}*, и последовательности экзонов 23—26. Данная форма белка из 216 аминокислот экспрессируется внутриклеточно и его функция до сих пор остается неизвестной. Зелеными прямоугольниками обозначены внегенные последовательности *int22h2* и *int22h3* гомологичные интрону 22 гена *F8* (*int22h1*).

Б. Ген *F8* с инверсией интрона 22 тоже имеет две полиаденилированные транскрипционные единицы: *F8_{FL}* и *F8_B*. Транскрипт *F8_{FL}* содержит 6756 оснований, таких же, как в нормальном транскрипте (из экзонов 1—22) и 48 дополнительных DCS оснований из экзона 23С. С него синтезируется укороченный белок *FVIII_{FL}*, который содержит 2159 аминокислотных остатков. Данный белок вместо циркуляции в кровеносном русле захватывается внутриклеточно.

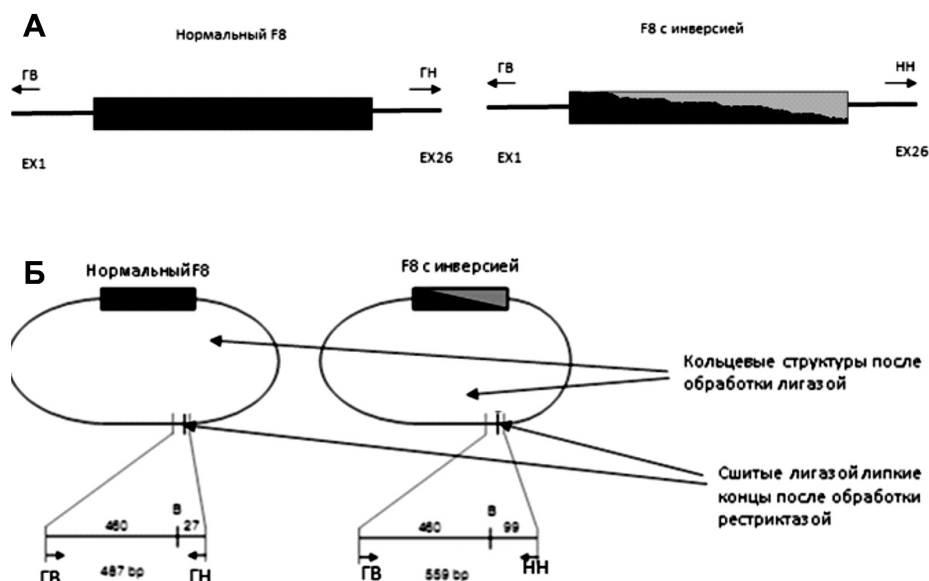


Рис. 2. Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*.
Фрагмент нормального и мутантного гена *F8*:
А — до лигирования; Б — после лигирования.
По L.C. Rossetti et al., 2005 [8], с изменениями. Объяснения в тексте.

годными для поиска инверсии гена *F8* методом инвертированной ПЦР. Для исследования были взяты образцы ДНК пробандов или, в случае их отсутствия или непригодности для анализа, образцы ДНК вероятных носительниц гемофилии — дочерей и матерей пробандов. Для тестирования метода семьи с направительным диагнозом гемофилия А и гемофилия В не выделялись в отдельные подвыборки.

ДНК была выделена из цельной крови, забранной в пробирку с антикоагулянтном ЭДТА с использованием набора реактивов для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) согласно протоколу производителя.

Для поиска наиболее частой при гемофилии А мутации в практику ФГБНУ «МГНЦ» была внедрена медицинская технология: «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*».

Данная технология является модификацией метода, описанного в статье L.C. Rossetti с соавторами [7, 8]. Во внедренной в практику технологии эндонуклеаза рестрикции BclII, производства «Thermoscientific» США была заменена ферментом отечественного производства Ksp22I (НПО «СибЭнзим», Россия), что не только существенно удешевило исследование, но и позволило

проводить рестрикцию и инактивацию фермента в более удобных температурных режимах: 37°C — 65°C.

На первом этапе производили обработку геномной ДНК эндонуклеазой рестрикции Ksp22I (НПО «СибЭнзим», Россия). Для проведения рестрикции использовали смесь в объеме 50 мкл: 30 мкл (1–2 мкг) геномной ДНК, 10 единиц активности фермента, 5 мкл фирменного буфера для эндонуклеазы, 5 мкг BSA и 5 мкл дистиллированной воды. Пробирки с рестрикционной смесью помещали в термостат для инкубации при температуре 37°C на 2 часа. После рестрикции инактивацию фермента проводили в течение 20 мин при 65°C. Далее фрагментированная ДНК сшивается в кольца с использованием фермента T4 лигазы («Thermoscientific», США). Реакцию лигирования проводится в объеме 600 мкл: 50 мкл продукта рестрикции геномной ДНК, 60 единиц активности фермента, 60 мкл фирменного буфера для эндонуклеазы и дистиллированная вода. Реакция проходила при комнатной температуре в течение двух часов. Полученные в результате лигирования кольцевые структуры пересаживали изопропанолом с последующим растворением ДНК дистиллированной водой до исходной концентрации 1–2 мкг в 30 мкл.

Таблица 1

Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для детекции инверсии интрона 22 гена *F8*

Последовательность праймеров, 5' → 3'	t отжига
ГВ 5'-ССТТТCAACTCCATCTCCAT-3' ГН 5'-ACATACGGTTTAGTCACAAGT-3' НН 5'-TCCAGTCACTTAGGCTCAG-3'	60°C

Далее с кольцевой ДНК проводили ПЦР на программируемом термоциклере МС2 фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием ДНК-полимеразы Bio-*taq* («БиоМастер», Россия). Синтез праймеров выполнен в ЗАО «Евроген» (Москва) (табл. 1).

ПЦР проводится по следующей схеме: к 23 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (67 mM Tris-HCl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Twin-20), по 0,4 мкМ каждого оригинального олигопраймера, по 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 6 mM MgCl₂, 1,6 M бетаина, 1,0 единицу активности термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 2 мкл кольцевой ДНК. В каждую пробирку добавляли 20 мкл минерального масла.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем 30 циклов смены температур: 94°C — 30 с, температура отжига праймеров 60°C — 1 мин, элонгация цепи 72°C — 1 мин 30 с; заключительная элонгация 72°C — 7 мин.

Для оценки результатов амплификации используется 7% полиакриламидный гель с соотношением акрилами-

да (АА) и бисакриламида (БА) 29:1. После разделения фрагментов гель окрашивается в растворе бромистого этидия (0,1 мкг/мл в 1хTBE) в течение 10 минут, промывается водой. Результаты электрофореза визуализируются с помощью документирующей системы «GelDoc» фирмы «BIO-RAD» (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм.

Интерпретацию результатов проводили на основании длин фрагментов, идентифицируемых на электрофорезе. При наличии в образце ДНК инверсии интрона 22 гена *F8* в гетерозиготном состоянии визуализируются два фрагмента с длинами 559 и 487 п.н.; при инверсии в гомозиготном состоянии — одна полоса длиной 559 п.н., при отсутствии инверсии интрона 22 в образце — одна полоса длиной 487 п.н. (табл. 2).

Для определения границ возможной перестройки или делеции после выявления системой фрагмента аномальной длины в одной из семей использовали праймеры, комплементарные последовательностям гена *F8*, фланкирующим экзоны с 1 по 25. Дизайн праймеров

Таблица 2

Интерпретация результатов

Ген	Детектируемый фрагмент	Статус	Длина, п.н.
<i>F8</i>	Инверсия интрона 22	норма/норма или норма	487
		мутация/норма	559/487
		мутация	559

Таблица 3

Праймеры и условия амплификации, применявшиеся для детекции экзонов гена *F8*.

Последовательность праймеров, 5' → 3'		t отжига
f8 1f	CACATCCAGTGGGTAAAGTTCC	62°C
f8 1r	CCTCCAAGCAGACTTACATCC	
f8 2f	GGAAGCATTACTTCCAGCTGC	
f8 2r	CCTCAAGATTGGGGAATCTGTG	
f8 14f1	GAATCTGTGTTATGAGTAACCAGAGTC	
f8 14r1	CAACTCTGTTGCTGCAGTTGTC	
f8 15f	GGCATTCTACCCACTTGGTAC	
f8 15r	CCAAAAGTGGGAATACATTATAGTCAGC	
f8 18f	GAGTATATCTGTGGGAGTGGAATCC	
f8 18r	GGAGCTTGTCTGCTTTGATCAC	
f8 19f	GCATAAACCAATGTATCTCATGCTC	
f8 19r	GGAAGAAAGCTGTAAAGAAGTAGGC	
f8 22f	GTTTCAGGAGGTAGCACATAC	
f8 22r	GTGTTTGTCCAATATCTGAAATCTGC	
f8 23f	GGAAGATATGATTGACAGAAATTGC	
f8 23r	CTAGAACAGTTAGTCACCCCTACC	
f8 25f	GAATTTCTGGGAGTAAATGGTGAC	
f8 25r	CTTTCTTTCTTTCCAAGGAGACC	

осуществлен в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ», синтез — в ЗАО «Евроген», Москва. Последовательности праймеров, входящих в реакцию, были выбраны согласно базе данных GeneBank (табл. 3).

ПЦР проводили на программируемом термочиклере МС2 фирмы «ДНК-технология» (Россия) с использованием ДНК-полимеразы Biotaq («БиоМастер»).

ПЦР проводили по следующей схеме: в 23 мкл реакционной смеси, содержащей 1х реакционный буфер (67 mM Tris-HCl, 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween-20, MgCl_2 4 mM), 0,4 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 4 mM MgCl_2 , 1,0 единицу активности термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 2 мкл геномной ДНК. В каждую пробирку добавляли 20 мкл минерального масла.

ПЦР проводили в следующем режиме: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем 30 циклов смены температур: 94°C — 45 с, температура отжига праймеров 62°C — 45 с, элонгация цепи 72°C — 45 с; заключительная элонгация 72°C — 7 минут.

Продукт реакции детектировался методом вертикального электрофореза в 7% ПААГ (соотношение АА:БА = 29:1). Результаты электрофореза визуализировали после окрашивания геля раствором бромистого этидия с помощью документирующей системы «Gel-Doc» фирмы «BIO-RAD» (США) в УФ-излучении с длиной волны 312 нм.

Результаты и обсуждение

Во всех 73 семьях с направительным диагнозом *гемофилия* был проведен поиск инверсии интрона 22 гена *F8* с использованием внедренной в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» новой медицинской технологии «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*». В 69 семьях направительный диагноз у пробанда был «*гемофилия А*» и в четырех семьях — «*гемофилия В*». В 40 семьях был доступен и пригоден для анализа образец ДНК пробанда, еще в 33 семьях исследование проводилось на материале вероятных носительниц: матерей и дочерей пробандов.

В результате проведенной молекулярно-генетической диагностики в 24 семьях была выявлена причина заболевания — инверсия интрона 22 гена *F8*. На рис. 3 представлена электрофореграмма результатов анализа. У всех матерей пробандов с мутацией, материал которых был доступен и пригоден для анализа (7 семей), было выявлено гетерозиготное носительство данной инверсии. Таким образом, инверсия интрона 22 была выявлена в 33% российских семей с направительным диагнозом «*гемофилия*», что согласуется с мировыми данными о частотах встречаемости данной мутации.

Интересно отметить, что инверсия интрона 22 гена *F8* была выявлена не только в семьях с направительным диагнозом «*гемофилия А*», но и в одной семье с диагнозом «*гемофилия В*». Данный факт подтверждает слож-

ность дифференциальной диагностики форм гемофилии на клиническом этапе обследования, даже при определении активности факторов свертывания в крови больного. Генетическое расстояние между генами *F8* и *F9* у женщин составляет 49 сМ, следовательно, маркеры, находящиеся в локусе гемофилии А практически в половине случаев рекомбинируют с маркерами локуса гемофилии В. Перекрывающиеся клинические и биохимические фенотипы различных форм гемофилий ставят под сомнение диагностическую ценность использования косвенных методов ДНК-диагностики даже при доказанном Х-сцепленном-рецессивном характере наследования болезни.

В одной семье с направительным диагнозом «*гемофилия А*» при проведении исследования у пробанда был выявлен фрагмент, длина которого существенно превышала длину ПЦР-продукта, соответствующего как норме, так и инверсии. У матери пробанда были выявлены два фрагмента — длина одного соответствовала ПЦР-продукту, который синтезируется с нормальной последовательности гена *F8*, длиной 487 п.н., второй фрагмент был такой же аномальной длины, как и у сына (рис. 4а). Нами было предположено, что причиной гемофилии в данной семье является неизвестная протяженная перестройка гена *F8*, локализованная между сайтами узнавания эндонуклеазы Ksp22I. Наличие такой перестройки может приводить к тому, что между сайтами рестрикции и последовательностями праймеров происходит вставка некоторого участка ДНК, удлиняющего амплифицируемую после лигирования последовательность, или к тому, что пропадает последовательность, комплиментарная одному из внутригенных праймеров ГВ или ГН, и эти праймеры отжигаются на другом участке ДНК. С лигата ДНК гемизиготного мальчика была проведена амплификация с двух пар праймеров: ГВ+ГН и ГВ+НН. ПЦР-продукт был получен только с пары внутригенных праймеров ГВ и ГН, его нуклеотидная последовательность была установлена методом автоматического секвенирования по Сенгеру. В результате секвенирования аномального фрагмента были получены последовательности интронов 14 и 21 гена *F8*. После этого был проведен анализ на наличие у больного делеции в гемизиготном состоянии с использованием праймеров, фланкирующих последовательности экзо-

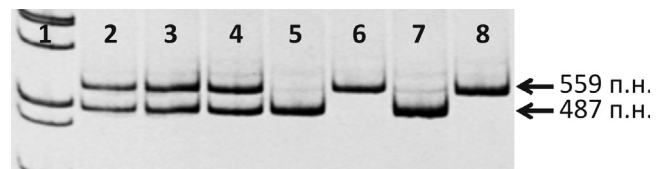


Рис. 3. Электрофореграмма результатов детекции инверсии интрона 22 гена *F8*.

Дорожка 1: маркер молекулярного веса λ /Pst1;

Дорожки 2, 3, 4: инверсия в гетерозиготном состоянии;

Дорожки 5, 7: норма;

Дорожки 6, 8: инверсия в гемизиготном состоянии.

нов с 1 по 25 гена *F8*. В качестве контроля использовались образцы ДНК матери больного и здорового мужчины. При обработке результатов исследования у пробанда было установлено отсутствие амплификации фрагментов, соответствующих эксонам 15—19 (рис. 4 Б, В). Таким образом, было установлено, что причиной гемофилии А в данной семье является протяженная перестройка гена *F8* с делецией экзонов с 15 по 19. Данный клинический пример показывает, что внедренная в практическую деятельность ФГБНУ «МГНЦ» медицинская технология обладает более широкими, чем

ожидалось, диагностическими возможностями и способна выявлять некоторые генные перестройки (протяженные делеции или инсерции гена *F8* до экзона 21), на долю которых по данным Factor VIII variant database (<http://www.factorviii-db.org/>) приходится не менее 4% мутаций гена *F8*.

Разработанный способ детекции инверсии интрона 22 гена *F8* повышает эффективность диагностики наследственных коагулопатий, позволяет оптимизировать финансовые и временные затраты поиска генетического варианта в семьях с гемофилией.

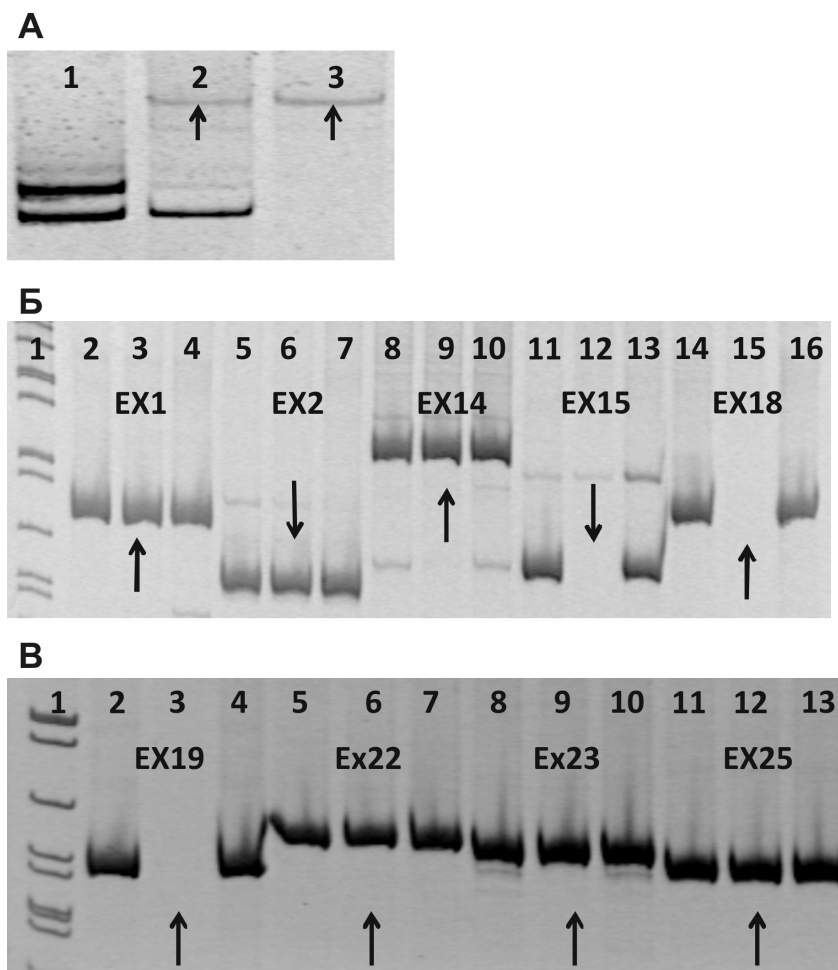


Рис. 4.

А. Электрофореграмма результатов анализа с использованием медицинской технологии.

Дорожка 2. Образец матери больного. Визуализируется фрагмент длиной 487 п.н., соответствующий норме и фрагмент аномальной длины (указан стрелкой).

Дорожка 3. Образец больного мальчика. Визуализируется только фрагмент аномальной длины (указан стрелкой).

Б. Электрофореграмма результатов амплификации с праймеров, фланкирующих экзоны гена *F8*.

Дорожка 1. Маркер молекулярного веса λ /Pst1.

Дорожки 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16 — контрольные образцы

Дорожки 3, 6, 9, 12, 15 – образец больного, указан стрелкой. На дорожках 12 и 15 выявлена делеция экзонов 15–18

В. Электрофореграмма результатов амплификации с праймеров, фланкирующих экзоны гена *F8*.

Дорожка 1. Маркер молекулярного веса λ /Pst1.

Дорожки 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13 – контрольные образцы

Дорожки 3, 6, 9, 12 — образец больного, указан стрелкой. На дорожке 3 выявлена делеция экзона 19.

Показаниями к использованию данной технологии являются:

1. Поиск молекулярно-генетических причин гемофилии А в отягощенных семьях;
2. Диагностика носительства гемофилии А;
3. Проведение пренатальной диагностики в отягощенных семьях;
4. Популяционные исследования частот носительства гемофилии А.

Противопоказания для использования технологии «Система детекции инверсии интрона 22 гена *F8*» отсутствуют.

Данная медицинская технология эффективна для детекции наиболее частой причины гемофилии А — инверсии интрона 22 гена *F8*. Использование данной технологии позволяет выявлять мутацию в геми- и гетерозиготном состоянии, не прибегая к специальным дорогостоящим методам детекции.

Внедрение в практику медицинской технологии, позволяющей эффективно детектировать инверсию, повысит точность диагностики гемофилии у российских больных, даст возможность прогнозировать тяжесть клинических проявлений коагулопатии, точно и эффективно проводить диагностику носительства и пренатальную диагностику в отягощенных семьях.

Список литературы

1. Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias—from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med*. 2001 Jun 7;344(23):1773-9. Review. Erratum in: *N Engl J Med* 2001 Aug 2;345(5):384.

2. Antonarakis SE, Kazazian HH, Tuddenham EG. Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. *Hum Mutat*. 1995;5(1):1-22. Review.

3. Sung Ho Hwang, Hee-Jin Kim and Hye Sun Kim (2012). Chapter 1 «Profiling of Mutations in the F8 and F9, Causative Genes of Hemophilia A and Hemophilia B», Hemophilia, Dr. Angelika Batorova (Ed.), ISBN: 978-953-51-0429-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/hemophilia/profiling-of-mutations-in-the-f8-and-f9-causative-genes-of-hemophilia-a-and-hemophilia-b>

4. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet*. 1993 Nov;2(11):1773-8.

5. Levinson B, Kenrick S, Lakich D et al. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics*. 1990; (7): 1-11.

6. Sauna ZE, Lozier JN, Kasper CK et al. The intron-22-inverted F8 locus permits factor VIII synthesis: explanation for low inhibitor risk and a role for pharmacogenomics. *Blood*. 2015 Jan 8;125(2):223-8.

7. Rossetti LC, Radic CP, Abelleiro MM et al. Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from southern blot to inverse shifting-PCR. *Int J Mol Sci*. 2011;12(10):7271-85.

8. 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.

Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

DNA diagnostics in Russian hemophilia patients with new medical technology «Detection system for *F8* Intron 22 inversion»

Beskorovainaya T.S., Milovidova T.B., Shchagina O.A., Polyakov A.V.

Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», 115409, Moscow, Moskvorechie 1, e-mail: polyakov@med-gen.ru

Hemophilia A (HA) is a frequent X-linked recessive bleeding disorder resulted from deficiency or dysfunction of coagulation factor VIII (FVIII). It affects 1 of 5000 males. HA is caused by mutations in *F8* gene located on chromosome Xq28 and consisted of 26 exons. More than 3000 mutations were described in the gene. The most common mutation is the intron 22 inversion (Inv22). It was found in 30–50% patients with severe HA. In this study we searched Inv22 in unrelated probands with diagnosis «Hemophilia» (40 patients) and relatives of probands whose material was not available (33 persons) from 73 Russian families using inverse shifting-PCR method. Inv22 was found in 33% cases. Mothers of probands with detected Inv22 were carriers of this mutation. Among the four probands with clinical diagnosis «hemophilia B» from the studied group Inv22 was found in one case.

Keywords: hemophilia, *F8*, Inv22, Inverse PCR