ORİJİNAL ARAŞTIRMA ORIGINAL RESEARCH

DOI: 10.5336/medsci.2020-75066

# Hemofili B Moleküler Analizinde Türkiye Deneyimi: F9 Gen Mutasyon Spektrumu ve Genotip-Fenotip İlişkisi

## Turkey Experience in Molecular Analysis of Hemophilia B: F9 Gene Mutation Spectrum and Genotype-Phenotype Correlation

Esra IŞIK[a], Bilçağ AKGÜN[a], Kaan KAVAKLI[b], Melike SEZGİN EVİM[c], Canan ALBAYRAK[d], Gülen TÜYSÜZ KİNTRUP[e], Fahri ŞAHİN[f], Bülent ANTMEN[g], Ebru YILMAZ KESKİN[h], Salih GÜLER[c], Davut ALBAYRAK[i], Osman Alphan KÜPESİZ[e], Hüseyin ONAY[i], Ferda ÖZKINAY[a,i], Tahir ATİK[a]

[a]Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Genetik Hastalıkları BD, İzmir, TÜRKİYE
[b]Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji BD, İzmir, TÜRKİYE
[c]Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji BD, Bursa, TÜRKİYE
[d]Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji BD, Samsun, TÜRKİYE
[e]Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji BD, Antalya, TÜRKİYE
[f]Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji BD, İzmir, TÜRKİYE
[g]Acıbadem Adana Hastanesi, Çocuk Hematoloji BD, Adana, TÜRKİYE
[h]Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji BD, Isparta, TÜRKİYE
[i]Medical Park Samsun Hastanesi, Çocuk Hematoloji BD, Samsun, TÜRKİYE
[j]Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, İzmir, TÜRKİYE

**ÖZET Amaç:** Hemofili B (HB), yaklaşık 30.000 canlı erkek doğumda bir görülen, X'e bağlı kalıtsal kanama bozukluğudur. Klinik bulgular, koagülasyon faktörü 9'un aktivite düzeyine göre değişkenlik gösterir. Bugüne kadar koagülasyon faktörü 9'u kodlayan F9 geninde 1.200'den fazla varyant tanımlanmıştır. Varyantların yaklaşık %70'ini nokta mutasyonları oluşturur. Bu çalışmada, Türkiye'deki HB hastalarında F9 gen varyant dağılımının belirlenmesi ve yeni varyantlar tanımlayarak genotip-fenotip ilişkisine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Türkiye'deki sekiz farklı merkezde HB tanısı ile takip edilen ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinde Kasım 2018-Ocak 2020 tarihleri arasında moleküler analizi yapılmış 55 hasta çalışmaya alınmıştır. Olguların klinik ve laboratuvar bulguları hastane kayıtlarından elde edilmiştir. F9 geni dizi analizi, yeni nesil dizi analizi platformu (MiSeq™ Illimuna) kullanılarak yapılmıştır. Saptanan yeni varyantların patojeniteleri ACMG 2015 kriterlerine göre sınıflandırılmıştır. Saptanan varyantlar ile fenotip ilişkisi değerlendirilmiştir. **Bulgular:** Çalışmaya alınan 55 erkek hastanın 33 (%60)'ünde ağır, 15 (%27,3)'inde orta ve 7 (%12,7)'sinde hafif HB fenotipi vardı. F9 dizi analizi sonucunda 54 (%98,2) olguda 46 farklı varyant saptandı. Bu varyantların 30 (%63,8)'u yanlış anlamlı, 9 (%19,1)'u anlamsız, 3 (%6,4)'ü çerçeve kayması ve 4 (%8,5)'ü kırpılma noktası mutasyonuydu. Belirlenen varyantların 10 tanesi daha önce literatürde tanımlanmamıştı. **Sonuç:** Bu çalışmada, Türkiye'deki HB hastalarında, moleküler analizin tanı başarısı ve F9 geninde varyant dağılımı literatüre benzer şekilde bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları, HB'nin genotipik olarak heterojen bir hastalık olduğunu desteklemektedir. On yeni varyant ilk kez bu çalışma ile tanımlanmış ve hastalığın genotip-fenotip ilişkisine katkıda bulunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Yeni nesil dizi analizi; hemofili B; mutasyon; genotip-fenotip ilişkisi

**ABSTRACT Objective:** Hemophilia B (HB) is an X-linked hereditary bleeding disorder seen in approximately one in 30,000 live male births. Clinical findings vary according to the activity level of the coagulation factor 9. More than 1,200 mutations have been identified in the F9 gene to date. Point mutations make up approximately 70% of the mutations. In this study, we aimed to determine the F9 gene mutation spectrum in HB patients in Turkey and to contribute to the genotype-phenotype relationships identifying novel mutations. **Material and Methods:** Fifty five patients who were followed with a diagnosis of HB in 8 different centers and molecularly analyzed in Ege University Faculty of Medicine in November 2018 and January 2020 enrolled to the study. Clinical and laboratory findings of patients were obtained from hospital records. F9 gene sequence analysis was performed using a next generation sequencing platform (MiSeq™ Illimuna) Pathogenicity of novel variants were classified according to ACMG 2015. The correlation between mutation distribution and phenotype was evaluated. **Results:** Among 55 HB patients enrolled in the study, severe HB phenotype were determined in 33 (60%), moderate in 15 (27.3%) and mild in 7 (12.7%). Molecular analysis was revealed 46 different variants in 54 patients (98.2%) of these variants, 30 were missense (63.8%), nine nonsense (19.1%), three frameshift (6.4%), and four splice site (8.5%) mutations. Ten of 46 variants identified has not previously been reported. In one patient no mutation was dertected by sequencing. **Conclusion:** In this study, the molecular diagnostic success rate and F9 gene mutation spectrum in Turkish HB patients was in accordance with the literature. The results of the study support that HB is a genotypically heterogeneous disease. Ten novel mutations were identified for the first time with this study and contributed to the genotype-phenotype relationship sof the disease.

**Keywords:** Next generation sequence analysis; hemophilia B; mutation; genotype-phenotype relation

**Correspondence:** Tahir ATİK
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Genetik Hastalıkları BD, İzmir, TÜRKİYE/TURKEY
**E-mail:** tahiratik@yahoo.com

Peer review under responsibility of Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.

***Received:*** 28 Mar 2020 ***Received in revised form:*** 07 Jun 2020 ***Accepted:*** 14 Jul 2020 ***Available online:*** 22 Sep 2020

2146-9040 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Kalıtsal kanama bozuklukları, toplu olarak, tüm dünyada 7,5 milyondan fazla insanı etkilemektedir. Von Willebrand hastalığı (VWH) en sık karşılaşılan kalıtsal kanama bozukluğudur. Bununla beraber hemofililer ağır kanama bozuklukları arasında en sık karşılaşılanıdır. Koagülasyon faktör (F) VIII eksikliği sonucu oluşan klinik tablo hemofili A (HA), FIX eksikliği sonucu oluşan ise hemofili B (HB) olarak isimlendirilir. Her iki hemofili tipi de X'e bağlı kalıtım göstermektedir. Klinik fenotip direkt olarak koagülasyon faktör düzeyi ile ilişkilidir ve bunun en önemli belirleyicisi olgudaki varyant tipidir.[1-5]

HB'den, X kromozomu üzerinde bulunan *F9* genindeki varyantlar sorumludur. Bugüne kadar *F9* varyant veri tabanında (*FIX* gene variant database by EAHAD), 3.700'den fazla bireyde belirlenmiş 1.000'in üzerinde farklı varyant bildirilmiştir.[1,5,6] HB'den sorumlu varyantların dağılımı incelendiğinde, nokta varyantlarının en sık (%73) olduğu, bunların da büyük kısmını yanlış anlamlı mutasyonların oluşturduğu görülmektedir.[6]

Son zamanlarda gerçekleşen moleküler genetik alanındaki hızlı gelişmeler ile birlikte, genetik hastalıkların tanısı ve altta yatan nedenlerin belirlenmesi kolaylaşmıştır. HB klinik ve laboratuvar bulgular eşliğinde kolaylıkla tanı konulabilen bir hastalık olmasına rağmen tanı anında altta yatan moleküler mekanizmanın belirlenmesi, inhibitör ve anafilaksi gelişim riskinin öngörülebilmesi açısından önemlidir. Ayrıca moleküler tanı, taşıyıcıların belirlenerek uygun genetik danışma verilebilmesini, preimplantasyon ve prenatal genetik tanı yapılabilmesini sağlamaktadır.[7]

Türkiye'den HB olgularında *F9* geni varyant dağılımını belirleyen bugüne kadar yapılmış iki araştırma bulunmaktadır. Onay ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 34 HB olgusunda bir büyük delesyon ve 25'i yanlış anlamlı, 8'i anlamsız olmak üzere 33 nokta mutasyonu tespit edilmiştir.[8] Çilingir ve ark. da 2005 yılında, 13 HB hastasında *F9* gen varyantlarını Sanger dizi analizi yöntemi ile araştırmış ve 2'si yeni olmak üzere 11 farklı varyant saptamışlardır.[9] Son zamanlarda, ülkemizde bu konuda yapılmış başka geniş kapsamlı çalışma bulunmamaktadır.

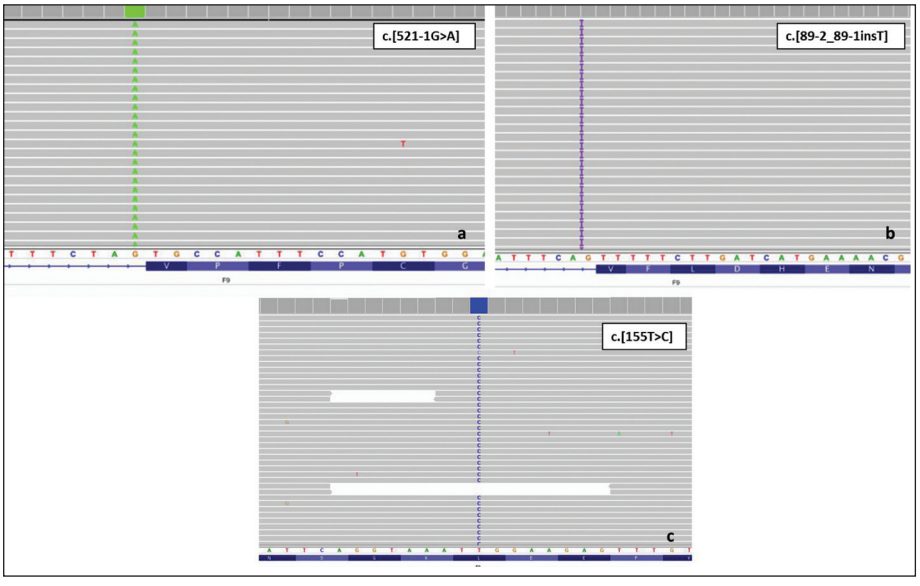
Bu çalışmada, ülkemizde hemofili moleküler genetik tanısında deneyimli bir merkez olan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı Laboratuvarı'nda 2018-2020 yılları arasında *F9* gen moleküler analizi gerçekleştirilmiş farklı ailelerden 55 HB olgusuna ait sonuçlar sunulmuştur. Çalışmada, geniş bir HB tanılı hasta grubunda, *F9* geni varyant spektrumunun ve genotip-fenotip ilişkisinin genişletilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Türkiye'deki 8 farklı merkezde, çocuk veya erişkin hematoloji klinikleri tarafından takip edilen, FIX:C düzeyleri ile FIX eksikliği gösterilmiş ve HB tanısı almış 55 olgu çalışmaya dâhil edildi. Olguların demografik verileri, klinik bulguları ve laboratuvar test sonuçları hastane kayıtlarından elde edildi. Hastalığın fenotipi; FIX aktivitesi <%1 ise "ağır", %1-5 arasında ise "orta" ve >%5 ise "hafif" olarak sınıflandırıldı.

Olguların *F9* geni moleküler analizleri, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalında Kasım 2018-Ocak 2020 tarihleri arasında yapıldı. Olgulara ait genomik DNA, 2 cc EDTA'lı periferik kandan QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Ltd, Crawley, Birleşik Krallık) kullanılarak izole edildi. *F9* geninin tüm ekzonik bölgelerini, ekzon-intron birleşkelerini ve promoter bölgesini amplifiye ederek DNA analizini gerçekleştirmek üzere "Hemophilia B NGS Sequencing Kit" (Multigen Sağlık Hizmetleri Ltd., İzmir, Türkiye) kullanıldı. MiSeq™ Illimuna (Illumina Co., San Diego, ABD) platformu kullanılarak oluşturulan amplikonların dizi analizi gerçekleştirildi.

Analiz sonucunda tespit edilen varyantların patojenitesi "American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)" tarafından yayımlanan 2015 tarihli rehbere göre sınıflandırıldı. Belirlenen varyantlar NCBI dbSNP build141 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/), 1000 Genomes Project (http://www.1000genomes.org/), Exome Aggregation Consortium (ExAC) http://exac.broadinstitute.org/) ve NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server (http://evs.gs.washington.edu/EVS/) veri tabanlarında değerlendirildi ve toplum sıklığı %1'den az olanlar seçildi. Varyantlar daha sonra *F9* geni var-




**ŞEKİL 1:** Yeni nesil dizi analizi sonucunda saptanan bazı varyantlara ait "Integrative Genomics Viewer (IGV)" görüntüleri: a) c.[521-1G>A], b) c.[89-2_89-1insT], c) c.[155T>C].

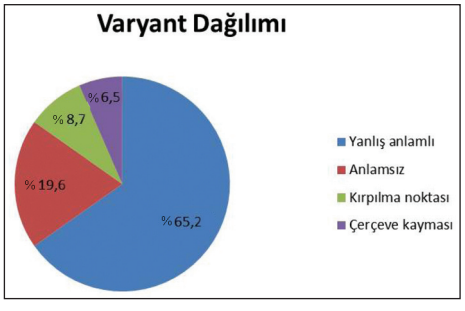
yant veri tabanı (http://www.factorix.org/) içerisinde aranarak, daha önce HB'de bildirilip bildirilmediği kontrol edildi. Daha önce bildirilmemiş yeni (novel) varyantların protein yapısı üzerindeki etkisi, çeşitli öngördürücü "in silico" analiz programları ile değerlendirildi (MutationTaster, Polyphen-2, SIFT vb.). PhyloP ve GERP algoritmaları kullanılarak, evrimsel korunmuşluk analiz edildi.[10-14]

Bu araştırma, Helsinki Bildirgesi Prensipleri'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onay verilmiştir (19-8.1T/48). Tüm olgular, bilgilendirilmiş onam alınarak araştırmaya dâhil edilmiştir.

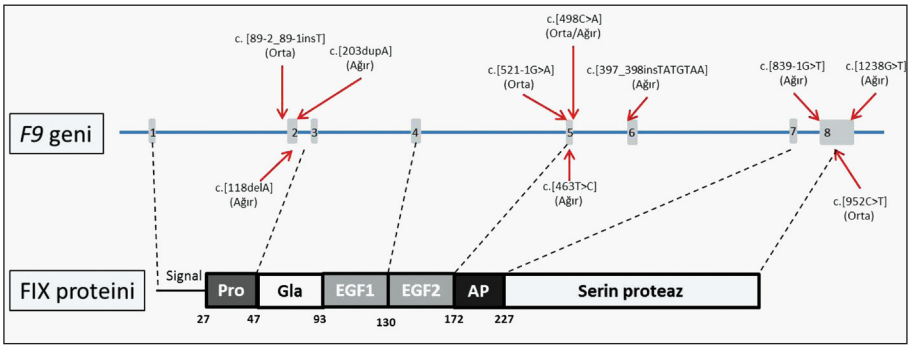
## BULGULAR

Birbiriyle akraba olmayan ailelerden toplam 55 HB olgusu çalışmaya dâhil edildi. Olguların tümü erkekti. Yaş ortalaması 17,40 (±15,01) yıl olarak bulundu. FIX:C düzeylerine göre, klinik fenotip, olguların 33 (%60)'ünde "ağır", 15 (%27,3)'inde "orta", 7 (%12,7)'sinde ise "hafif" HB olarak sınıflandırıldı. İnhibitör gelişim öyküsü açısından yapılan sorgulamada sadece ağır HB'li 1 (%1,8) olguda inhibitör gelişimi bildirildi.

*F9* gen dizi analizi sonucunda 54 (%98,2) olguda 46 farklı varyant saptandı. Saptanan bazı varyantlara ait "Integrative Genomics Viewer (IGV)" görüntüleri Şekil 1'de görülmektedir. Bu varyantların 30 (%65,2)'u yanlış anlamlı, 9 (%19,6)'u anlamsız, 4 (%8,7)'ü kırpılma noktası ve 3 (%6,5)'ü çerçeve kayması mutasyonuydu (Şekil 2). Bir olguda dizi analizi ile varyant saptanamadı, ancak bu olguda *F9* geninin, 2, 3 ve 4. ekzonlarına ait okuma IGV programında görüntülenemedi. Bu durum, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)nda *F9* geninin 2, 3 ve 4. ekzonlarının amplifikasyon başarısızlığı olarak değerlendirildi. Daha sonra tekrarlanan PZR analizlerinde bu bölge yine çoğaltılamadı. Varyantların gen içerisinde dağılımı değerlendirildiğinde, 13'ü ekzon 8 (%28,3)'de, 11'i ekzon 2 (%23,9)'de, 9'u ekzon 5 (%19,6)'te, 4'ü ekzon 6 (%8,7)'da, 2'si




**ŞEKİL 2:** Elli dört hastada saptanan 46 farklı varyantın varyant tipine göre dağılımını gösteren grafik. En sık olarak (%65,2) yanlış anlamlı varyantlar saptanmıştır.




**ŞEKİL 3:** Çalışma grubunda saptanan 10 yeni varyantın F9 gen içindeki dağılımı ve ilişkili oldukları klinik tablo.

ekzon 4 (%4,3)'te, 2'si ekzon 7 (%4,3)'de ve 1'i ekzon 3 (%2,2)'te yerleşmişti. Kırpılma bölgesi değişikliğine sebep olan 4 (%8,7) varyant intronik yerleşimliydi. Belirlenen varyantların 10 (%21,7)'u, daha önce veri tabanlarında bildirilmemiş yeni varyantlardı (Şekil 3). Çalışma grubunda saptanan tanımlı ve yeni varyantların moleküler özellikleri ve varyantlar ile ilişkili fenotip sırasıyla Tablo 1 ve Tablo 2'de görülmektedir. Bunların 6'sı "null" varyant olup "patojenik" ve 4'ü de "yanlış anlamlı" varyant olup "olası patojenik" olarak sınıflandırılmıştır.

Tüm olgular genotip-fenotip ilişkisi açısından değerlendirildiğinde, yanlış anlamlı varyant saptanan 33 olgunun 20 (%60,6)'si ağır fenotip gösterirken, 6 (%18,2)'sı orta, 7 (%21,2)'si hafif fenotipteydi. "Null" varyant saptanan 21 olgunun 13 (%61,9)'ü ağır, 8 (%38,1)'i ise orta fenotipteydi (Şekil 4).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada *F9* geni yeni nesil dizi analizi yöntemi ile analiz edilmiş 55 HB hastasının varyant dağılımı sunulmuştur. Moleküler analiz sonucunda hastaların %98,2'sinde (54 hasta) etiyoloji belirlenmiş ve en sık olarak yanlış anlamlı varyantlar (%60) saptanmıştır. Son 20 yılda birçok farklı toplumda, HB olgularında *F9* geninde varyant dağılımını bildiren çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir.[15-17] Rydz ve ark. 2013 yılında Kanada referans genotiplendirme laboratuvarın sonuçlarını sunmuşlardır.[18] Veri tabanında kayıtlı 267 HB hastasının %94'ünde moleküler etiyoloji belirlenmiştir ve hastaların %65'inden yanlış anlamlı varyantların sorumlu olduğunu göstermişlerdir. Mårtensson ve ark. *F9* dizi analizi ve MLPA (mültipleks ligasyon bağımlı prob amplifikasyonu) yöntemleri ile 113 İsveç'li HB ailesinin %61'inde yanlış anlamlı olmak üzere tamamında varyant saptamışlardır.[16] Khan ve ark. ise 36 aileden 52 HB olgusunu *F9* dizi analizi ile değerlendirmiş ve 21 aileden 34 olguda 17 farklı varyant bildirmişlerdir.[15] Bu konuda ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde, Onay ve ark. 34 HB olgusunun tamamında ve Çilingir ve ark. da 13 HB olgusunun %84,6'sında (11 hasta) varyant saptamışlardır.[8,9] Bizim çalışmamızda da varyant saptanma oranı ve dağılımı literatüre benzer şekilde bulunmuştur.

Hemofili B hem fenotip hem de genotip olarak heterojen bir hastalıktır. "Null" varyantlar genellikle ağır fenotip ile ilişkili iken yanlış anlamlı varyantlar her üç fenotipe de yol açabilirler.[19] Mårtensson ve ark. çalışmasında, "null" varyant taşıyan 41 olgunun %82,9'unda ve yanlış anlamlı varyant taşıyan 69 olgunun %17,4'ünde ağır fenotip bildirilmiştir.[16] Lu ve ark. 294 HB ailesinde yaptıkları çalışmada yanlış anlamlı varyant taşıyan 164 olgunun %38'inde ağır, %50'sinde orta ve %12'sinde hafif fenotip bildirmişlerdir.[20] Aynı çalışmada "null" varyant taşıyan 122 olgunun %44,3'ünde ağır fenotip gözlenmiştir. Bir başka çalışmada ise "null" varyant taşıyan 39 olgunun ağır, yanlış anlamlı varyant taşıyan 67 olgunun ise %49,3'ünün orta ve 47,8'inin de ağır HB fenotipi gösterdiği bildirilmiştir. Literatüre benzer şekilde bizim çalışmamızda "null" varyant taşıyan olguların çoğunluğunda (%61,9) ağır HB fenotipi ve yanlış anlamlı varyant taşıyan olgularda da her üç HB fenotipi gözlenmiştir, Ancak yanlış anlamlı varyant

**TABLO 1:** Çalışma grubunda saptanan tanımlı varyantların moleküler özellikleri ve ilişkili oldukları hastalık fenotipleri.

| Nükleotid değişimi | Amino asit değişimi | Mutasyon tipi | Pozisyon | Klinik fenotip* |
|---|---|---|---|---|
| c.[128G>T] | p.(Arg43Leu | Yanlış anlamlı | Ekzon 2 | Ağır |
| c.[128G>A ] | p.(Arg43Gln) | Yanlış anlamlı | Ekzon 2 | Ağır |
| c.[138G>C] | p.(Arg46Ser) | Yanlış anlamlı | Ekzon 2 | Ağır |
| c.[155T>C] | p.(Leu52Ser) | Yanlış anlamlı | Ekzon 2 | Hafif |
| c.[163T>A] | p.(Phe55Ile) | Yanlış anlamlı | Ekzon 2 | Hafif |
| c.[188A>G] | p.(Glu63Gly) | Yanlış anlamlı | Ekzon 2 | Hafif |
| c.[190T>C] | p.(Cys64Arg) | Yanlış anlamlı | Ekzon 2 | Ağır |
| c.[205T>C] | p.(Cys69Arg) | Yanlış anlamlı | Ekzon 2 | Orta |
| c.[223C>T] | p.(Arg75Ter) | Anlamsız | Ekzon 2 | Ağır |
| c.[277G>C] | p.(Asp93His) | Yanlış anlamlı | Ekzon 3 | Ağır |
| c.[304T>C] | p.(Cys102Arg) | Yanlış anlamlı | Ekzon 4 | Ağır |
| c.[316G>A] | p.(Gly106Ser) | Yanlış anlamlı | Ekzon 4 | Hafif |
| c.[421T>C] | p.(Cys141Arg) | Yanlış anlamlı | Ekzon 5 | Ağır |
| c.[422G>A] | p.(Cys141Tyr) | Yanlış anlamlı | Ekzon 5 | Ağır(2) |
| c.[423C>A] | p.(Cys141Ter) | Anlamsız | Ekzon 5 | Ağır |
| c.[434G>A] | p.(Cys145Tyr) | Yanlış anlamlı | Ekzon 5 | Orta |
| c.[484C>T] | p.(Arg162Ter) | Anlamsız | Ekzon 5 | Orta/Ağır |
| c.[520G>A] | p.(Val174Met) | Yanlış anlamlı | Ekzon 5 | Ağır(2) |
| c.[571C>T] | p.(Arg191Cys) | Yanlış anlamlı | Ekzon 6 | Ağır |
| c.[572G>A] | p.(Arg191His) | Yanlış anlamlı | Ekzon 6 | Hafif |
| c.[677G>A] | p.(Arg226Gln) | Yanlış anlamlı | Ekzon 6 | Ağır |
| c.[720G>A] | p.(Trp240Ter) | Anlamsız | Ekzon 6 | Orta |
| c.[724-2A>G] | | Kırpılma bölgesi | Intron6 | Ağır |
| c.[760G>T] | p.(Gly254Cys) | Yanlış anlamlı | Ekzon 7 | Ağır |
| c.[835G>A] | p.(Ala279Thr) | Yanlış anlamlı | Ekzon 7 | Hafif |
| c.[880C>T] | p.(Arg294Ter) | Anlamsız | Ekzon 8 | Ağır |
| c.[892C>T] | p.(Arg298Ter) | Anlamsız | Ekzon 8 | Ağır(3)/Orta(2) |
| c.[936C>G] | p.(Tyr312Ter) | Anlamsız | Ekzon 8 | Orta |
| c.[1025C>T] | p.(Thr342Met) | Yanlış anlamlı | Ekzon 8 | Orta |
| c.[1045G>T] | p.(Gly349Ter) | Anlamsız | Ekzon 8 | Orta |
| c.[1088G>T] | p.(Gly363Val) | Yanlış anlamlı | Ekzon 8 | Ağır |
| c.[1135C>T] | p.(Arg379Ter) | Anlamsız | Ekzon 8 | Ağır |
| c.[1136G>A] | p.(Arg379Gln) | Yanlış anlamlı | Ekzon 8 | Ağır |
| c.[1169T>C] | p.(Ile390Thr) | Yanlış anlamlı | Ekzon 8 | Hafif |
| c.[1297G>A] | p.(Glu433Lys) | Yanlış anlamlı | Ekzon 8 | Orta |
| c.[1304G>A] | p.(Cys435Tyr) | Yanlış anlamlı | Ekzon 8 | Ağır |

*Parantez () içindeki veriler, varyantın belirtilen klinik fenotipte kaç hastada bulunduğunu göstermektedir.

taşıyan olgularda ağır HB sıklığı literatüre göre yüksek bulunmuştur. Bu durum çalışmamızdaki hasta sayısının diğer çalışmalara göre daha düşük olması ile açıklanabilir.

Bu çalışma ile 55 HB olgusunda 46 farklı varyant belirlenmiştir. Hemofili B olgularında *F9* geninde saptanan varyantların büyük kısmı, aktif faktör IX'un fonksiyonel serin proteaz bölgesini kodlayan, boyut olarak da en büyük, ekzon 8 içerisinde tespit edilmektedir.[5] Bizim çalışmamızda da, ekzon 8'de belirlenen varyantlar, en sık olarak, varyantların %28,3'ünü oluşturmaktaydı.

On bir olguda saptanan on varyant daha önce veri tabanlarında kayıtlı olmayıp ilk kez bizim çalış-

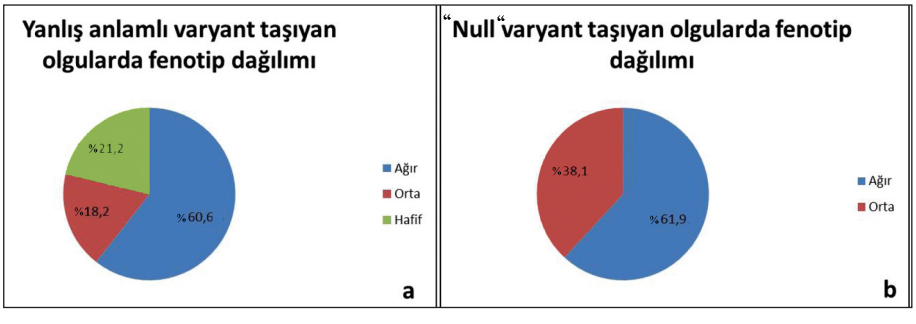
**TABLO 2:** Çalışma grubunda saptanan yeni mutasyonların moleküler özellikleri ve ilişkili oldukları hastalık fenotipleri.

| Mutasyon (DNA) | Mutasyon (Protein) | Mutasyon tipi | Lokasyon | Patojenite | DANN skoru | Mutation Taster | SIFT | GERP | Hastalık fenotipi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| c.[89-2_89-1insT] | | Kırpılma bölgesi | Intron 1 | Patojenik | - | Hastalık yapıcı | - | 5,19 | Orta |
| c.[118delA] | p.(Ile40PhefsTer2) | Çerçeve kayması | Ekzon 2 | Patojenik | - | Hastalık yapıcı | - | 5,19 | Ağır |
| c.[203dupA] | p.(Cys69ValfsTer2) | Çerçeve kayması | Ekzon 2 | Patojenik | - | Hastalık yapıcı | - | 5,19 | Ağır |
| c.[397_398ins TATGTAA] | p.(Thr133IlefsTer5) | Çerçeve kayması | Ekzon 5 | Patojenik | - | Hastalık yapıcı | - | 4,94 | Ağır |
| c.[463T>C] | p.(Cys155Arg) | Yanlış anlamlı | Ekzon 5 | Olası patojenik | 0,9969 | Hastalık yapıcı | Hastalık yapıcı | 4,94 | Ağır |
| c.[498C>A] | p.(Asn166Lys) | Yanlış anlamlı | Ekzon 5 | Olası patojenik | 0,9923 | Hastalık yapıcı | Hastalık yapıcı | 5,0799 | Orta/Ağır |
| c.[521-1G>A] | | Kırpılma bölgesi | Intron5 | Patojenik | 0,9951 | Hastalık yapıcı | - | 5,13 | Orta |
| c.[839-1G>T] | | Kırpılma bölgesi | Intron7 | Patojenik | 0,9899 | Hastalık yapıcı | - | 5,42 | Ağır |
| c.[952C>T] | p.(Leu318Phe) | Yanlış anlamlı | Ekzon 8 | Olası patojenik | 0,9989 | Hastalık yapıcı | Hastalık yapıcı | 5,6599 | Orta |
| c.[1238G>T] | p.(Gly413Val) | Yanlış anlamlı | Ekzon 8 | Olası patojenik | 0,9979 | Hastalık yapıcı | Hastalık yapıcı | 5,6599 | Ağır |

DANN: deleterious annotation of genetic variants using neural networks (Yapay sinir ağları kullanarak genetik varyantların hastalık yapıcı etkisinin öngörülmesi)
SIFT: The scale-invariant feature transform (Ölçekle değişmeyen özellik dönüşümü)
GERP: Genomic Evolutionary Rate Profiling (Genomik Evrimsel Korunmuşluk Profili).

mamızda tanımlanmıştır. Bu varyantlar ACMG kriterlerine göre patojenik veya olası patojenik olarak sınıflandırılmaları sebebiyle hastalık ile ilişkili olarak düşünülmüşlerdir. "Null" varyant saptanan 6 olgunun dördü ağır ve ikisi orta HB fenotipi, yanlış anlamlı varyant saptanan beş hastanın ise üçü ağır ikisi orta HB fenotipi göstermektedir. Yeni varyantlardan bir tanesi, c.498C>A, iki ailede birden saptanmıştır. İki ailenin aynı yeni varyantı taşıması sebebiyle, hem analiz her iki olgu için de tekrarlanmış ve aynı bulgu konfirme edilmiş hem de ayrıntılı aile değerlendirmesi ile akrabalık açısından incelenmiştir. Her iki aile arasında akrabalık olmadığı düşünülmektedir. Ancak bunu doğrulamak amacıyla ileri bir moleküler analiz gerçekleştirilmemiştir.

Çalışmamızda belirlenen tanımlı varyantlardan dört tanesi birden fazla ailede tespit edilmiştir. İki olguda saptanan c.422G>A (p.Cys141Tyr ) varyantı, daha önce *F9* gen varyant veri tabanında yedi kez bildirilmiş olup olguların altısı ağır ve biri orta fenotip göstermektedir. Bizim çalışmamızdaki her iki olguda ağır HB klinik ve laboratuvar bulguları mevcuttu. Biri ağır biri orta HB kliniği gösteren iki olguda belirlenen c.484C>T (p.Arg162Ter ) varyantının, veri tabanında 22 defa rapor edildiği ve bu olguların orta veya ağır fenotipte olduğu görülmektedir. *F9* gen varyant veri tabanında 2 kez ağır fenotip ile ilişkili olarak rapor edilmiş olan c.520G>A (p.Val174Met) varyantı ise çalışmamızda ağır fenotipte iki olguda saptanmıştır. Çalışmamızda beş olguda tanımlanan c.892C>T (p.Arg298Ter) varyantı veri tabanında 63 kez bildirilmiş olup, bu olguların büyük kısmı ağır fenotiptedir. Bizim olgularımızın üçü ağır, ikisi orta fenotip göstermektedir. *F9* geninde yer alan aynı var-




**ŞEKİL 4:** Çalışma grubunda saptanan a) Yanlış anlamlı ve b) "Null" varyantların ilişkili oldukları fenotipik dağılımı gösteren grafikler. Yanlış anlamlı varyantların her 3 fenotipik tabloya da yol açtığı görülmüştür.

yantların farklı klinik tablolara yol açabileceği bilinmektedir.[15] Bu durum klinik fenotipin ortaya çıkmasında varyant tipinden başka faktörlerin de (çevresel, epigenetik veya modifiye edici genler) etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Hemofili B'de inhibitör gelişimi nadir olarak görülse de (<%5) morbidite ve mortaliteyi etkileyen önemli bir komplikasyondur. Rydz ve ark. 246 HB hastasının dördünde (%2) inhibitör gelişimi bildirmişlerdir.[18] Bizim çalışmamızda da benzer şekilde 55 HB olgusundan sadece birinde inhibitör saptanmıştır. Ağır HB fenotipi gösteren bu olguda *F9* geninde c.118delA varyantı tespit edilmiştir. Bu varyant bir çerçeve kayması varyantı olup, daha önce literatürde bildirilmemiştir.

## SONUÇ

Bu çalışmada Türkiye'de sekiz farklı hematoloji kliniği tarafından takip edilen ve tek merkezde moleküler analizleri yapılmış olan 55 HB hastasının klinik ve genetik sonuçları sunulmuştur. Bu çalışma ülkemizdeki Hemofili B hastalarında *F9* geni varyant dağılımının belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Sonuç olarak, moleküler dizi analizin tanı başarısı ve *F9* geninde varyant dağılımı literatüre benzer şekilde bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları Hemofili B'nin genotipik olarak heterojen bir hastalık olduğunu desteklemektedir. On yeni varyant tanımlanması ile genotip-fenotip ilişkisine katkıda bulunulmuştur.

### *Finansal Kaynak*

*Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.*

### *Çıkar Çatışması*

*Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin, çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.*

### *Yazar Katkıları*

***Fikir/Kavram:** Esra Işık, Tahir Atik; **Tasarım:** Esra Işık, Tahir Atik; **Denetleme/Danışmanlık:** Kaan Kavaklı, Hüseyin Onay, Ferda Özkınay, Tahir Atik; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Bilçağ Akgün, Fahri Şahin, Melike Sezgin Evim, Salih Güler, Canan Albayrak, Davut Albayrak, Gülen Tüysüz Kintrup, Osman Alphan Küpesiz, Bülent Antmen, Ebru Yılmaz Keskin; **Analiz ve/veya Yorum:** Esra Işık, Tahir Atik; **Kaynak Taraması:** Esra Işık, Tahir Atik; **Makalenin Yazımı:** Esra Işık, Tahir Atik; **Eleştirel İnceleme:** Kaan Kavaklı, Ferda Özkınay, Tahir Atik; **Malzemeler:** Esra Işık, Tahir Atik.*

## KAYNAKLAR

1. Soucie JM, Evatt B, Jackson D. Occurrence of hemophilia in the United States. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators. Am J Hematol. 1998;59(4):288-94. [Crossref]
2. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. Blood. 1987;69(2):454-9. [Crossref] [PubMed]
3. Werner EJ, Broxson EH, Tucker EL, Giroux DS, Shults J, Abshire TC. Prevalence of von Willebrand disease in children: a multiethnic study. J Pediatr. 1993;123(6):893-8. [Crossref]
4. Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, James P. The prevalence of symptomatic von Willebrand disease in primary care practice. J Thromb Haemost. 2010;8(1):213-6. [Crossref] [PubMed]
5. Swystun LL, James PD. Genetic diagnosis in hemophilia and von Willebrand disease. Blood Rev. 2017;31(1):47-56. [Crossref] [PubMed]
6. Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. J Thromb Haemost. 2013;11(7):1329-40. [Crossref] [PubMed]
7. Perez JB, Coon LM, Majerus JA, Chen D, Pruthi RK. Factor IX Gene (F9) genotyping trends and spectrum of mutations identified: a reference laboratory experience. Semin Thromb Hemost. 2018;44(3):287-92. [Crossref] [PubMed]
8. Onay UV, Kavakli K, Kilinc Y, Gurgey A, Aktuglu G, Kemahli S, et al. Molecular pathology of haemophilia B in Turkish patients: identification of a large deletion and 33 independent point mutations. British Journal of Haematology (BJH). 2003;120(4):656-9. [Crossref] [PubMed]
9. Çilingir O, Müslümanoğlu MH, Özdemir M, Kavaklı K, Solak M, Artan S. [Factor IX gene mutations in Turkish haemophiliacs]. The Medical Journal of Kocatepe. 2005;6(1):1-6.
10. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc. 2009;4(7):1073-81. [Crossref] [PubMed]
11. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. Nat Methods. 2010;7(8):575-6. [Crossref] [PubMed]

12. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods. 2010;7(4):248-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
13. Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. Genome Res. 2010;20(1):110-21. [Crossref] [PubMed] [PMC]
14. Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. PLoS Comput Biol. 2010;6(12):e1001025. [Crossref] [PubMed] [PMC]
15. Khan MTM, Naz A, Ahmed J, Shamsi T, Ahmed S, Ahmed N, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in a Pakistani Cohort with Hemophilia B. Clin Appl Thromb Hemost. 2018;24(5):741-8. [Crossref] [PubMed] [PMC]
16. Mårtensson A, Letelier A, Halldén C, Ljung R. Mutation analysis of Swedish haemophilia B families-high frequency of unique mutations. Haemophilia. 2016;22(3):440-5. [Crossref] [PubMed]
17. Yu T, Dai J, Liu H, Ding Q, Lu Y, Wang H, et al. Spectrum of F9 mutations in Chinese haemophilia B patients: identification of 20 novel mutations. Pathology. 2012;44(4):342-7. [Crossref]
18. Rydz N, Leggo J, Tinlin S, James P, Lillicrap D. The Canadian "National Program for hemophilia mutation testing" database: a ten-year review. Am J Hematol. 2013;88(12):1030-4. [Crossref] [PubMed]
19. Konkle BA, Huston H, Fletcher SN. Hemophilia B. 2000 Oct 2 [Updated 2017 Jun 15]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, eds. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. Available from: [PubMed]
20. Lu Y, Wu X, Dai J, Ding Q, Wu W, Wang X. The characteristics and spectrum of F9 mutations in Chinese sporadic haemophilia B pedigrees. Haemophilia. 2019;25(2):316-23. [Crossref] [PubMed]