

혈우병 A의 발병에 관여하는 유전적 요인

경북대학교 의과대학 소아과학교실

심 예 지 · 이 건 수

Genetic Risk Factors of Hemophilia A

Ye Jee Shim and Kun Soo Lee

Department of Pediatrics, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

Hemophilia A is a sex-linked recessive coagulation disorder associated with diverse mutations of the factor VIII gene and a variety of phenotypes. The type of mutation involved dictates the activity of factor VIII, and in turn the severity of bleeding episodes and development of alloantibodies against factor VIII (inhibitors). Missense mutations are the most common genetic risk factors for hemophilia A, especially mild to moderate cases, but carry the lowest risk for inhibitor development. On the other hand, intron 22 inversion is the most common mutation associated with severe hemophilia A and is associated with high risk of inhibitor formation. Large deletions and nonsense mutations are also associated with high risk of inhibitor development. Additional mutations associated with hemophilia A include frameshift and splice site mutations. It is therefore valuable to assess the mutational backgrounds of hemophilia A patients in order to interpret their symptoms and manage their health problems.

Key Words: Hemophilia A, Factor VIII gene, Mutation, Inhibitor

서 론

혈우병 A는 VIII 인자 유전자의 이상으로 인해 VIII 인자의 활성이 감소하거나 혈장내 VIII 인자 수준이 감소하여 지혈에 장애가 생기는 성염색체 열성 유전질환이다. 약 2/3에서 가족력이 있으며 나머지 1/3에서 산발적으로 발생한다. 전 세계적으로 남자 백만 명당 105-160명 정도의 빈도로 추산된다¹⁾.

혈우병 A는 정상보다 감소된 FVIII:C (VIII 인자의 pro-

coagulant activity, 정상치 50-200%)를 측정함으로써 진단할 수 있다. FVIII:C가 1% (0.01 IU/mL) 미만이라면 중증(severe), 1-5% (0.01-0.05 IU/mL)라면 중등증(moderate), 5% 초과 40% 미만(0.05-0.4 IU/mL)이라면 경증(mild)으로 정의한다²⁾. 보통 중증 혈우병 A 환자의 경우에는 특별한 외상없이도 관절 및 근육의 자연 출혈이 자주 생길 수 있는 반면, 경증 환자의 경우에는 자연 출혈은 드물며 수술이나 치과 치료, 사고 후에 지혈이 되지 않는 증상이 주로 나타나 중증도에 따라 증상이 서로 다르다. 전체 혈우병 A 환자 중 중증, 중등증, 경증 환자는 각각 70%, 15%, 15% 정도를 차지한다³⁾.

1970년대부터 혈장 추출 VIII 인자 농축물이, 그리고 1990년대부터 유전자 재조합(recombinant) VIII 인자 농축물이 이용가능하게 되어 최근 들어 중증 혈우병 A 환자의 치료 및 예방에 뚜렷한 성과가 있었다. 그러나 VIII 인자 농축물로 응고인자 대치요법을 받은 적이 있는 사람들 중 일부에서 항체

접 수: 2010년 6월 6일

수정본접수: 2010년 6월 18일

게재승인일: 2010년 6월 25일

게재일: 2010년 6월 30일

책임저자: 이건수

우700-721, 대구광역시 중구 동덕로 200

경북대학교병원 소아청소년과

Tel: 053)420-5713, 5704, Fax: 053)425-6683

E-mail: kslee@mail.knu.ac.kr

(inhibitor, VIII 인자에 대한 alloantibody)가 발생하여 통상의 치료에 반응이 없어지고, 특히 그 빈도가 중증 환자의 경우에 더 높아 중요한 문제점으로 생각되고 있다⁴⁾.

혈우병 A는 비교적 유병률이 높은 유전질환일 뿐 아니라 다양한 표현형과 치료로 인한 항체 발생 등이 VIII 인자 유전자 이상과 관계가 있으며, 새로운 돌연변이 발생 비율도 높아 인간의 유전자 이상에 대해 연구하기에 적합한 질환이다⁵⁾.

VIII 인자 유전자와 VIII 인자의 특성

1. VIII 인자 유전자의 특성

VIII 인자 유전자는 X 염색체 장완(Xq28)에 위치(Fig. 1A)하는 26개의 exon과 25개의 intron으로 구성된 전체 길이 186 kb의 거대한 유전자이다⁶⁾(Fig. 1B). 26개의 exon 중 exon 14와 exon 26은 각각 3,106 bp, 1,958 bp로 비교적 size가 크고, 나머지 24개의 exon은 69-262 bp 정도이

다. 그리고 intron 22 안에는 2개의 nested gene인 FVIII A (factor VIII associated gene A)⁷⁾와 FVIII B (factor VIII associated gene B)⁸⁾가 존재한다(Fig. 1B). VIII 인자 유전자로부터 9 kb 크기의 mRNA가 부호화(encoding)되고, 이로써 2,351개의 아미노산으로 구성된 VIII 인자 전구 단백질로 유전암호해독(translation)된다^{6, 9)}(Fig. 1C).

2. VIII 인자의 구조와 활성화

VIII 인자 전구 단백질은 3개의 A domain, 1개의 B domain, 2개의 C domain, 그리고 3개의 acidic region (a1, a2, a3)으로 이루어져 있으며, IX 인자, X 인자, phospholipid, von Willebrand 인자와 각각 상호작용할 수 있는 부분이 존재한다^{10, 11)}(Fig. 1D). VIII 인자 유전자의 특정 돌연변이로 인해 VIII 인자 단백질의 특정 부분에 이상이 생겨 지혈에 관여하는 다른 요소들과의 상호작용에 문제가 생기면 혈우병 A가 발병하게 되는 것이다. N-terminal signal peptide인 19개의 아미노산이 제거되고 난 후의 최종 산물인 성숙한 VIII 인

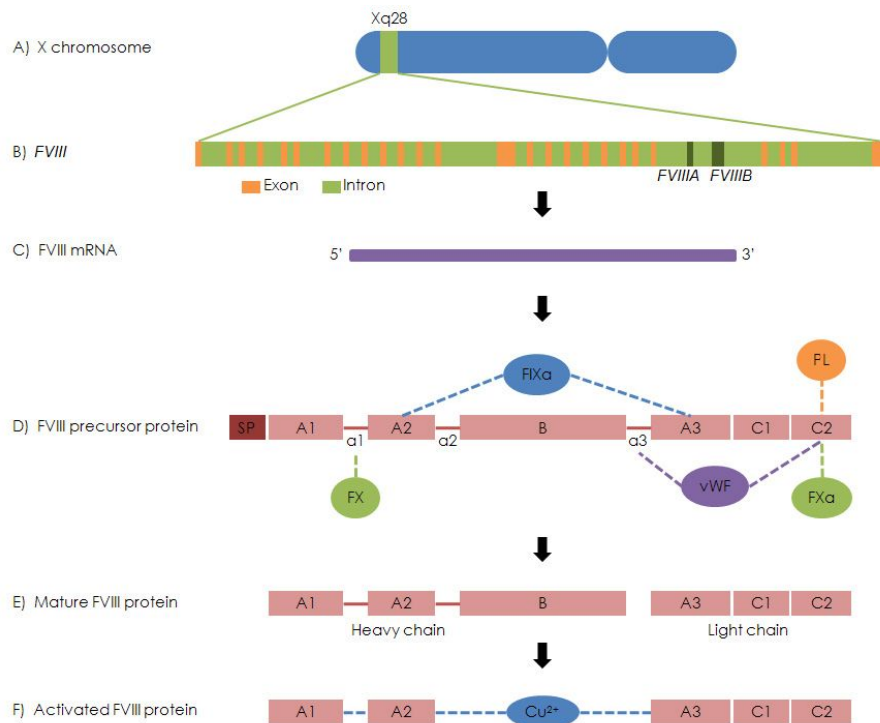


Fig. 1. Characteristics of *FVIII* (factor VIII gene) and activation of factor VIII protein: adapted from reference 52. *FVIII* is located in Xq28 (A). *FVIII* is composed of 26 exons and 25 introns, and there are two additional genes (*FVIII A* and *FVIII B*) in intron 22 (B). *FVIII* is translated into factor VIII precursor protein through *FVIII* mRNA (C). Factor VIII has several interaction sites with other coagulation components like FIX (Factor IX), FX (Factor X), PL (phospholipid), and vWF (von Willebrand factor) (D). After cleavage at a1 and a2, and being eliminated B and a3 domain by thrombin, activated FVIII protein is held by Cu²⁺ (E and F).

자 단백질 분자는 2,332개의 아미노산으로 구성된 267kD의 당단백질이다¹²⁾ (Fig. 1E).

VIII 인자의 활성화는 트롬빈(thrombin)과 활성화된 X 인자에 의해 VIII 인자 단백질이 분해됨으로써 단계적으로 일어난다^{12, 13)}. Arginine 1,689 지점(a3)의 분할이 일어나 A1-A2-B로 이루어진 90-210 kDa 정도의 heavy chain과 A3-C1-C2로 이루어진 80 kDa 정도의 light chain으로 분리된다(Fig. 1E). 다시 Arginine 740 지점(a2)의 분할로 대부분의 B domain이 제거되고, Arginine 372 지점(a1)의 분할로 A1과 A2 domain 사이가 갈라져 활성화된 VIII 인자 단백질은 구리 이온(Cu²⁺)에 의해 묶여 하나의 복합체로 존재한다(Fig. 1F).

3. 혈액 응고 과정과 VIII 인자의 기능

VIII 인자는 내인경로(intrinsic pathway)에서 핵심적인 역할을 하는 응고인자이다. 주로 간세포에서 생합성되는 VIII 인자는 혈장으로 방출되어 혈관내피세포에서 분비되는 von Willebrand 인자와 비공유결합을 한 상태로 순환함으로써 혈장 안에서 분해되지 않고 안정된 상태로 존재할 수 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 트롬빈에 의해 von Willebrand 인자와의 결합이 끊어진 후 활성화된 VIII 인자는 IX 인자를 활성화시키는 보조인자(cofactor)로써 작용한다. 그리고 phospholipid membrane, 활성화된 IX 인자, X 인자 기질이 막결합복합체를 형성하여

(Xase complex) X 인자를 활성화시킨다¹⁷⁻¹⁹⁾. 그 결과 프로트롬빈(prothrombin)은 트롬빈으로 활성화되고, 섬유소원(fibrinogen)이 섬유소(fibrin)로 변화하여 혈액이 응고된다.

혈우병 A 발병에 관여하는 유전자 이상

1. Intron 22 inversion (Fig. 3)

VIII 인자 유전자의 intron 22 (32 kb)에는 FVIII가 포함되어 있는데, VIII 인자 유전자의 끝분절(telomere) 쪽으로 각각 500 kb, 600 kb 떨어진 지점에 FVIII와 같은 반복서열이 2개 존재한다^{20, 21)}. 이 부분은 9.5 kb의 DNA로써, 특별히 돌연변이의 기전을 반영한 명칭으로 int22h (intron 22 homologous region)이라고 명칭한다²²⁾. Int22h1과 int22h2 (또는 int22h3) 사이의 상동재조합(homologous recombination)으로 인해 exon 1-22가 exon 23-26으로부터 분리되어 역전(inversion) 및 전위(translocation) 후 다시 합쳐짐으로써 intron 22 inversion이 발생한다²⁰⁻²²⁾. 이 돌연변이는 전체 혈우병 A의 약 36%, 중증 환자의 약 45%를 차지하는 대표적인 유전적 요인이다²³⁻²⁵⁾ (Fig. 2). 역전은 반복되어 나타나고, 그 발생 빈도가 한 세대의 생식세포 유전자당 4-7.2 X 10⁻⁶ 정도이므로 intron 22 inversion의 발생 빈도가 높은 것으로 생각된다^{21, 26)}.

2. Intron 1 inversion (Fig. 4)

VIII 인자 유전자 안의 intron 1에는 int1h 유전자(1,041 bp)가 포함되어 있고, VIII 인자 유전자의 끝분절 쪽으로 140 kb 되는 지점에 그와 같은 반복서열이 존재하여 각각 int1h1, int1h2라고 부른다. 마찬가지로 두 유전자 사이의 상동재조합으로 인해 혈우병이 발생한다^{27, 28)}. 전체 혈우병 A 환자의 약 1%, 중증 환자의 약 2.5%에서 발견되는 비교적 드문 돌연변이이다²³⁻²⁵⁾ (Fig. 2).

3. Large deletion (>50 bp) (Fig. 5)

혈우병 A 발병의 원인으로 VIII 인자 유전자의 한 부분 혹은 여러 부분에 걸친 exon의 결실(deletion)이 보고된 바 있다²⁹⁻³³⁾. 특히 VIII 인자 유전자는 Alu element가 풍부한 유전자이며, exon 결실의 정확한 번곡점(breakpoint)을 찾는 노력의 결과 Alu-연관재조합(Alu-mediated recombination)이 주된 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다³⁴⁻³⁷⁾. 예를 들

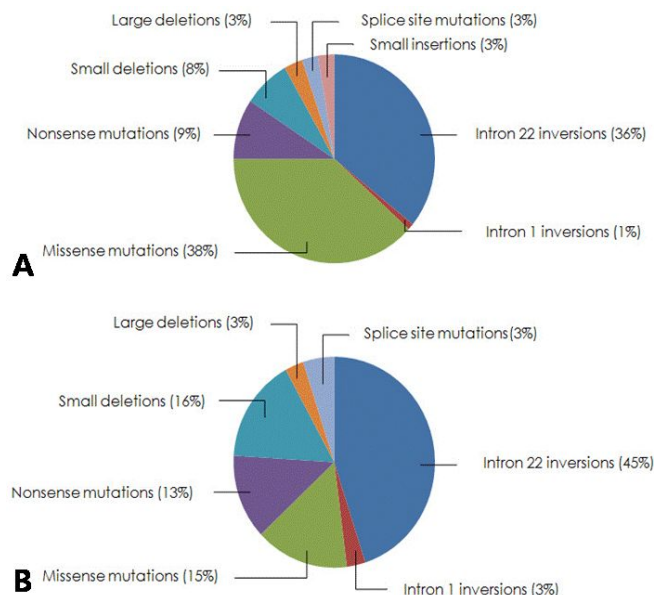


Fig. 2. Genetic profiles of hemophilia A and severe hemophilia A. Missense mutations are the most common mutations in hemophilia A (A), while intron 22 inversion is often seen in severe hemophilia A (B).

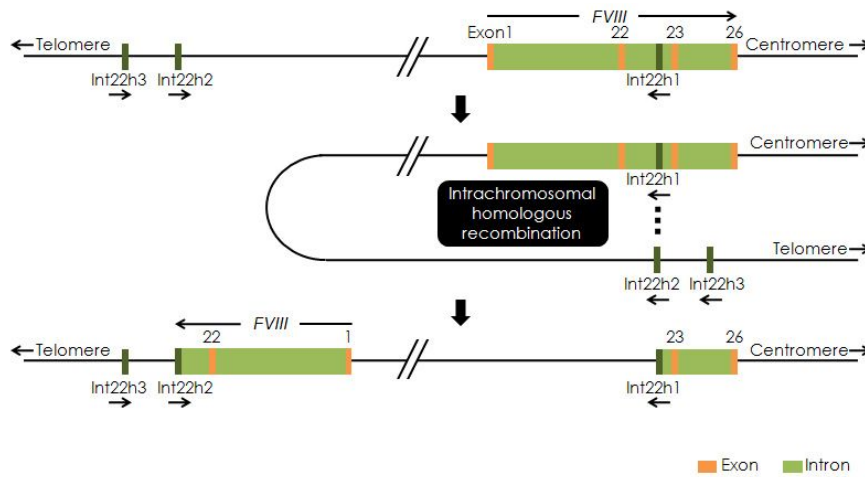


Fig. 3. Intron 22 inversion of *FVIII* (factor VIII gene): adapted from reference 20 and 52. Translocation and rejoining of *FVIII* occurs by intrachromosomal homologous recombination between *int22h1* and *int22h2* inversion, which is the most frequent mutation found in severe hemophilia A.

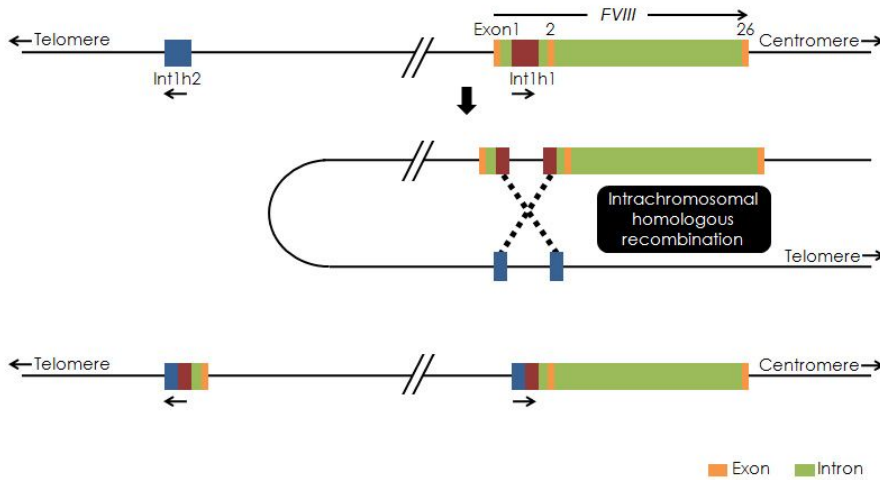


Fig. 4. Intron 1 inversion of *FVIII* (factor VIII gene): adapted from reference 27 and 52. This is a rare mutation associated with severe hemophilia A that is the result of intrachromosomal homologous recombination between *int1h1* and *int1h2*.

어 VIII 인자 유전자의 intron 3과 intron 10에 위치하는 같은 Alu sequence로 인해 상동재조합이 일어나면, exon 4-10의 결실이 생기게 된다³⁵⁾ (Fig. 5). 전체 혈우병 A의 약 3%, 중증 환자의 약 2-5%가 이러한 large deletion에 의해 발생한다²³⁻²⁵⁾ (Fig. 2).

4. Point mutation: missense & nonsense mutation (Fig. 6)

Point mutation의 약 3분의 1이 CpG dinucleotide에서 일어나는 것으로 보고되어 유전자 이상의 주요 지점으로 알

려져 있으며^{38, 39)}, 그 중 90% 정도가 CG→TG 또는 CG→CA transition에 의한 것으로 보고된다³⁹⁾. VIII 인자 유전자에서도 CpG dinucleotide는 point mutation이 빈번히 일어나는 지점이다^{40, 41)}. VIII 인자 유전자 coding sequence에는 70개의 CpG site가 존재하며, 그 중 7개가 Taq I site (recognition sequence TCGA: exon 7, 13, 18, 22, 23, 24, 26)에서 발견된다. 그 중 5개가 CGA (Arginine) codon이며, C→T transition으로 TGA stop codon이 생길 수 있다¹²⁾.

예를 들어 CGT→CAT로 Arginine이 Histidine으로 바뀌

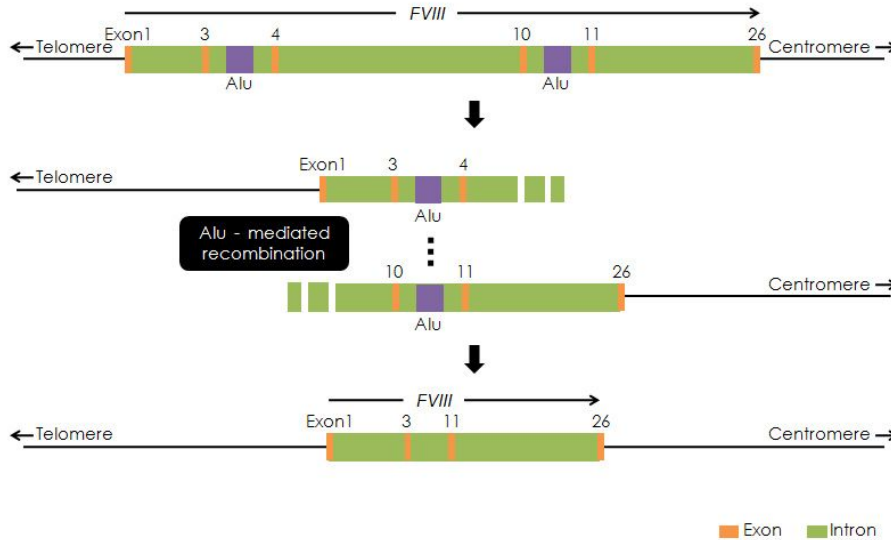


Fig. 5. Large deletion of *FVIII* (factor VIII gene): adapted from reference 35. After Alu-mediated recombination between intron 3 and 10, exons 4–10 were eliminated from *FVIII* resulting in severe hemophilia A.

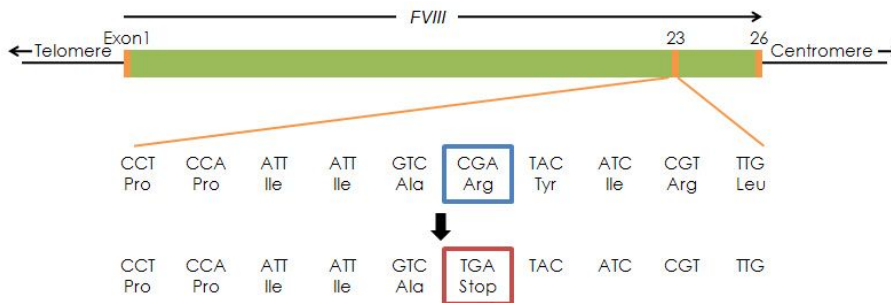


Fig. 6. Nonsense mutation of *FVIII* (factor VIII gene): adapted from reference 42. The substitution of a stop codon (TGA) for arginine (CGA) by C→T replacement leads to early termination of translation resulting in severe hemophilia A.

면 VIII 인자 단백질의 아미노산 변화로 경증 혹은 중등증 혈우병 A가 발생하게 된다(missense mutation). 반면 CGA→TGA로 Arginine이 stop codon으로 바뀌면 유전암호해독의 조기 종말로 인해 VIII 인자 단백질은 정상보다 훨씬 짧아지게 되고, 그 결과 중증 혈우병 A가 발생하게 된다(nonsense mutation)⁴²⁾ (Fig. 6).

Point mutation은 전체 혈우병 A 돌연변이의 약 반수를 차지하며(missense mutation 38%, nonsense mutation 9%), 중증 환자의 28% (missense 15%, nonsense 13%) 정도를 차지하는 가장 흔한 유전적 요인이다²³⁻²⁵⁾. Point mutation이 가장 빈번히 일어나는 장소는 exon 23의 codon 2,150 지점으로 알려져 있다⁴³⁾.

5. Frameshift mutation: small deletion & insertion

Exon 14 codon 1,191–1,194 지점의 가장 긴 9개의 adenine nucleotide에서 A deletion이 34회, insertion이 12회 보고되어 frameshift mutation이 빈번하게 일어난다고 알려져 있다⁴³⁾. 이러한 경우에는 모두 유전암호해독 동안의 frameshift 발생으로 중증 혈우병 A가 발생하게 된다.

그러나 한 가족 안의 세 명의 중등증 환자가 exon 14의 1,441 codon에 위치한 T 결실에 의해 A8TA2 sequence가 A10으로 바뀌어 발병한 것으로 밝혀졌다. 이렇게 기대했던 것보다 표현형이 경하게 나타나는 것은 DNA replication/ RNA transcription error로 인해 reading frame의 복원(restoration)이 일어나고, 또한 ‘ribosomal frameshifting’으로 인해 정상적인 VIII 인자 polypeptide가 생성되기 때문인 것으로 생

각된다⁴⁴⁾.

Frameshift mutation은 전체 혈우병 A 돌연변이의 약 10%를 차지한다(small deletion 7.5%, small insertion 2.6%, combination of insertion and deletion 0.1%)²³⁾. 그리고 중증 혈우병 A의 약 16-17%가 small deletion에 의해 발생한다^{24, 25)} (Fig. 2).

6. Splice site mutation

전체 혈우병 A의 2.6%, 중증 환자의 약 3.5-7%가 splice site mutation에 의해 발생한다²³⁻²⁵⁾ (Fig. 2).

VIII 인자 항체 형성에 관여하는 유전자 이상

VIII 인자에 항체(inhibitor)가 생기는 것은 혈우병 A 환자의 치료 과정 중 가장 심각한 문제로, 그 빈도는 약 20-50% 정도로 알려져 있다⁴⁵⁻⁴⁷⁾. 항체는 VIII 인자 농축물로 응고인자 대체요법을 받은 적이 있는 사람들에서만 발생하며, 중증도에 관계없이 평균 24% 정도에서 발생할 수 있으나 중증 환자의 경우에는 52% 정도로 항체 생성의 빈도가 훨씬 높다⁴⁾.

증상이 나타나기 전에 항체 생성을 예측하기는 어렵지만, 대개 침습적 시술이나 수술 전에 항체 생성에 대한 선별검사를 하고 시술 후 첫 50일 동안 항체 생성의 위험이 가장 높으므로 그 동안에 항체 생성에 대한 주기적인 검사를 시행하는 것이 필요하다⁴⁸⁾. 항체 검사는 BIA (Bethesda inhibitor assay)로 하고, 역가는 BU (Bethesda Unit)로 표시한다. 항체가 5 BU/mL 미만이면 저역가(low titer), 5 BU/mL 이상이면 고역가(high titer)라고 부르며, VIII 인자 농축물을 투여했을 때 5 BU/mL 미만으로 유지되면 저반응(low responder), 5 BU/mL 이상이 되면 고반응(high responder)이라고 한다²⁾.

항체 발생의 위험 정도는 VIII 인자 돌연변이 종류와 연관성이 있다^{49, 50)}. VIII 인자 단백질의 생산이 방해되거나 끝이 잘려나가 버리는 돌연변이(intron 22 inversion, large deletion, nonsense mutation)의 경우 훨씬 항체 생성의 위험이 높아서 그 빈도가 35% 정도이며, VIII 인자 단백질이 생산될 수 있으나 그 기능에 이상이 생기는 종류의 돌연변이(mis-sense mutation, small deletion)의 경우에는 그 위험이 낮아서 5% 정도이다⁵¹⁾. 전체 혈우병 A 돌연변이 각각을 살펴 보았을 때 항체 형성의 비율은 large deletion (41%), non-sense mutation (31%), intron 22 inversion (21%), in-

tron 1 inversion (17%), small deletion (16%), splice site mutation (17%), missense mutation (5%) 순으로 보고되었다²⁴⁾.

항체가 발생한 혈우병 A 환자에게는 VIII 인자 농축물로 응고인자를 대체하는 통상의 치료가 효과가 없으므로 다른 방법이 필요하다. VIII 인자 활성도를 우회(bypass)하여 혈액 응고를 유도하기 위하여 aPCC (activated prothrombin complex concentrates)나 rFVIIa (recombinant activated factor VII)를 주입할 수 있다. 또한 대량의 VIII 인자 농축물을 정기적으로 오랜 기간 투여하여 항체를 없애는 방법, 혹은 추가적인 면역 억제 등이 시도되고 있으나 여전히 그 치료와 관리에는 어려움이 많다.

참고문헌

- 1) O'Mahoney B. Global haemophilia care challenge and opportunities: World Federation of Haemophilia, 2002: Available form: http://www.wfh.org/2/docs/Programs/Plenary2002_final.pdf.
- 2) White GC 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. 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; 85:560.
- 3) Lanzkowsky P. Manual of pediatric hematology and oncology. 4th ed. Elsevier academic press, 2005:312.
- 4) Ehrenforth S, Kreuz W, Linde R, Funk M, Gungor T, Krackhardt B, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* 1992;71:594-8.
- 5) Haldane JBS. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J Genetics* 1935;31:317.
- 6) Gitschier J, Wood WI, Goralka YM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984;312:326-30.
- 7) 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;7:1-11.
- 8) Levinson B, Bermingham JR Jr, Metzzenberg A, Kenwrick S, Chapman V, Gitschier J. Sequence of the human factor VIII-associated gene is conserved in mouse. *Genomics* 1992;13:862-5.
- 9) Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, Pittman DD, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 1984;

- 312:342-7.
- 10) Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 1998;92:3983-96.
 - 11) Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias - from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001;344:1773-9.
 - 12) Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, et al. Structure of human factor VIII. *Nature* 1984;312:337-42.
 - 13) Lollar P, Knutson GJ, Fass DN. Activation of porcine factor VIII:C by thrombin and factor Xa. *Biochemistry* 1985;24:8056-64.
 - 14) Vlot AJ, Koppelman SJ, Bouma BN, Sixma JJ. Factor VIII and von Willebrand factor. *Thromb Haemostat* 1998;79:455-65.
 - 15) Kaufman RJ, Pipe SW. Regulation of VIII expression and activity by von Willebrand factor. *Thromb Haemostat* 1999;82:201-8.
 - 16) Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. Stabilization of Factor VIII in Plasma by the von Willebrand Factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest* 1977;60:390-404.
 - 17) Saenko EL, Shima M, Sarafanov AG. Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc Med* 1999;9:185-92.
 - 18) Saenko EL, Ananyeva NM, Tuddenham EG, Kembell-Cook G. Factor VIII - novel insights into form and function. *Br J Haematol* 2002;119:323-31.
 - 19) Van Dieijen G, Tans G, Rosing J, Hemker HC. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem* 1981;256:3433-42.
 - 20) Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993;5:236-41.
 - 21) 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;2:1773-8.
 - 22) 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;4:1217-24.
 - 23) Oldenburg J, Ananyeva NM, Saenko EL. Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia* 2004;10:133-9.
 - 24) Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* 2006;12:15-22.
 - 25) Repesse Y, Slaoui M, Ferrandiz D, Gautier P, Costa C, Costa JM, 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;5:1469-76.
 - 26) Millar DS, Kakkar VV, Cooper DN. Screening for inversions in the factor VIII (F8) gene causing severe haemophilia A. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994;5:239-42.
 - 27) 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.
 - 28) Brinke A, Tagliavacca L, Naylor J, Green P, Giangrande P, Giannelli F. Two chimaeric transcription units result from an inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene and a region reportedly affected by reciprocal translocations in T-cell leukaemia. *Hum Mol Genet* 1996;5:1945-51.
 - 29) Youssoufian H, Antonarakis SE, Aronis S, Tsiftis G, Phillips DG, Kazazian JJ Jr. Characterization of five partial deletions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3772-6.
 - 30) Bardoni B, Sampietro M, Romano M, Crapanzano M, Mannucci PM, Camerino G. Characterization of a partial deletion of the factor VIII gene in a haemophiliac with inhibitor. *Hum Genet* 1988;79:86-8.
 - 31) Salviato R, Belvini D, Are A, Radossi P, Tagariello G. Large FVIII gene deletion confers very high risk of inhibitor development in three related severe haemophiliacs. *Haemophilia* 2002;8:17-21.
 - 32) Woods-Samuels P, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE. Nonhomologous recombination in the human genome: deletions in the human factor VIII gene. *Genomics* 1991;10:94-101.
 - 33) Van de Water N, Williams R, Ockelford P, Browett P. A 20.7 kb deletion within the factor VIII gene associated with LINE-1 element insertion. *Thromb Haemost* 1998;79:938-42.
 - 34) Vidal F, Farssac E, Tusell J, Puig L, Gallardo D. First molecular characterization of an unequal homologous alu-mediated recombination event responsible for hemophilia. *Thromb Haemost* 2002;88:12-6.
 - 35) Rossetti LC, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. homologous recombination between AluSx-sequences as a cause of hemophilia. *Hum Mut* 2004;24:440.
 - 36) Nakaya SM, Hsu TC, Geraghty SJ, Manco-Johnson MJ, Thomsom AR. Severe hemophilia A due to a 1.3 kb factor VIII gene deletion including exon 24: homologous recombination between 41 bp within an Alu repeat sequence in introns 23 and 24. *J Thromb*

- Haemost 2004;2:1941-5.
- 37) Sommer SS, Scaringe WA, Hill KA. Is Alu-mediated recombination an important cause of hemophilia? *Thromb Haemost* 2002;88:3-4.
 - 38) Cooper DN, Krawczak M. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum Genet* 1990; 85:55-74.
 - 39) Cooper DN, Yousoufian H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet* 1988;78:151.
 - 40) Yousoufian H, Kazazian HH Jr, Phillips DG, Aronis S, Tsiftis G, Brown VA, et al. Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature* 1986;324:380-2.
 - 41) Antonarakis SE, Yousoufian H, Kazazian HH Jr. Molecular genetics of hemophilia A in man (factor VIII deficiency). *Mol Biol Med* 1987;4:81-94.
 - 42) Mikami S, Nishimura T, Naka H, Kuze K, Fukui H, Tone M, et al. Nonsense mutations in factor VIII gene of a severe haemophiliac patient with anti-factor VIII antibody. *Jpn J Human Genet* 1988;33:409-15.
 - 43) Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Wacey AI. The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res* 1998;26: 216-9. Available form: <http://hadb.org.uk>
 - 44) Young M, Inaba H, Hoyer LW, Higuchi M, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE. Partial correction of a severe molecular defect in hemophilia A, because of errors during expression of the factor VIII gene. *Am J Hum Genet* 1997;60:565-73.
 - 45) Kreuz W, Becker S, Lenz E, Martinez-Saguer I, Escuriola-Ettingshausen C, Funk M, et al. Factor VIII Inhibitors in Patients with Hemophilia A: Epidemiology of Inhibitor Development and Induction of Immune Tolerance for Factor VIII. *Semin Thromb Haemost* 1995;21:382-9.
 - 46) Scharrer I, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophiliacs. A review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993;4:753-8.
 - 47) Brettler DB. Inhibitors in congenital haemophilia. *Baillieres Clin Haematol* 1996;9:319-29.
 - 48) Darby SC, Keeling DM, Spooner RJ, Wan Kan S, Giangrande PL, Collins PW, et al. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of the UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99. *J Thromb Haemost* 2004;2:1047-54.
 - 49) Oldenburg J, Schroder J, Brackmann HH, Muller-Reible C, Schwaab R, Tuddenham E. Environmental and genetic factors influencing inhibitors development. *Semin Hematol* 2004;41:82-8.
 - 50) Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, et al. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* 1995;74:1402-6.
 - 51) Bolton-Maggs PH, Pasi J. Haemophilia A and B. *Lancet* 2003;361:1801-9.
 - 52) 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.