

# Molekularne uwarunkowania hemofilii B

Edyta Odnoczko , Daria Malarczyk , Agata Adamiec 

Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych,  
Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

## Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Odnoczko E, Malarczyk D, Adamiec A. The molecular basis of hemophilia B. *J. Trans Med* 2022; 15 (2): 159–164. DOI: 10.5603/JTM.2022.0013. Należy cytować wersję pierwotną

## Streszczenie

*Hemofilia B jest uwarunkowaną genetycznie skazą krwotoczną, spowodowaną brakiem lub zmniejszeniem syntezy osoczowego czynnika krzepnięcia IX (FIX). Na podłoże molekularne hemofilii B składa się dość duża liczba (> 1200) różnych wariantów genetycznych o różnej lokalizacji, co dowodzi znacznej heterogenności tej skazy krwotocznej. Fenotyp krwotoczny hemofilii B nie zawsze idealnie koreluje z aktywnością koagulacyjną FIX:C w osoczu, dlatego poznanie mechanizmu molekularnego hemofilii B może być pomocne w zrozumieniu niejednorodności fenotypu krwotocznego i pogłębieniu wiedzy na temat diagnozowania i leczenia pacjentów obarczonych tą chorobą. W niniejszym artykule przedstawiono uwarunkowania molekularne hemofilii B wraz z omówieniem ich patomechanizmu w poszczególnych domenach FIX.*

**Słowa kluczowe:** hemofilia B, czynnik krzepnięcia IX, domena FIX, gen F9, mutacja sprawcza

*J. Transf. Med.* 2022; 15: 165–170

Czynnik krzepnięcia IX (FIX, *factor IX*) jest białkiem zależnym od witaminy K, a jego niedobór powoduje skazę krwotoczną — hemofilię B (HB) — uwarunkowaną genetycznie chorobę recesywną związaną z chromosomem X. Przypadek pierwszego pacjenta z HB, Stephena Christmаса, został opisany w 1952 roku, dlatego choroba ta zwana jest też chorobą Christmаса. W przeciwieństwie do hemofilii A, HB występuje znacznie rzadziej i stanowi około 15–20% wszystkich przypadków hemofilii; częstość jej występowania wynosi około 1 na 30 000 żywo urodzonych chłopców. Nasilenie krwawień w HB jest skorelowane z aktywnością koagulacyjną FIX (FIX:C, *FVIII coagulation activity*) w osoczu chorego. Na tej podstawie sklasyfikowano trzy postaci choroby: ciężka z FIX:C < 1% (< 0,01 jm./ml), umiarkowana z FIX:C 1–5%

(0,01–0,05 jm./ml) oraz łagodna z FIX:C 5–40% (0,05–0,40 jm./ml).

Wiadomo, że fenotyp krwotoczny HB nie zawsze odpowiada idealnie powyższej klasyfikacji postaci choroby w odniesieniu do FIX:C. Ponadto pozostaje niejasne, dlaczego pacjenci z tą samą mutacją sprawczą HB w niektórych przypadkach wykazują zróżnicowane tendencje do krwawień, od łagodnych do ciężkich. Dlatego uważa się, że poznanie mechanizmu molekularnego HB może być pomocne w zrozumieniu niejednorodności fenotypu krwotocznego i dostarczeniu istotnych informacji na temat diagnozowania i leczenia chorych. Duża liczba różnych wariantów genetycznych zidentyfikowanych w HB (> 1200) dowodzi, że jej podłoże molekularne jest bardzo heterogenne.

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Edyta Odnoczko, Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, ul. I. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: [eodnoczko@ihit.waw.pl](mailto:eodnoczko@ihit.waw.pl)

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

Gen FIX (*F9*), sklonowany w 1982 roku, stanowi 34 kb długiego ramienia chromosomu X (Xq27.1) i składa się z 8 eksonów i 7 intronów. mRNA *F9* o wielkości 2,8 kb (NM\_000133) koduje białko prekursorowe zawierające 461 aminokwasów (aa), w tym N-końcowy peptyd sygnałowy (1-28 aa) i propeptyd (29-46 aa) oraz dojrzałe białko 415-aa, w którym wyróżnia się: domenę Gla (47-92 aa), dwie domeny podobne do naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*) (93-171 aa), sekwencję łącznikową (172-191 aa), peptyd aktywacyjny (AP, *activation peptide*) 192-226 aa) i domenę proteazy serynowej (SP, *serine protease*) (227-461 aa). Ekson 1 koduje peptyd sygnałowy, ekson 2 — propeptyd i Gla, ekson 3 — część Gla, eksony 4 i 5 — EGF, ekson 6 — AP, a eksony 7 i 8 — SP.

Czynnik FIX należy do glikoprotein syntetyzowanych przede wszystkim w wątrobie zależnie od witaminy K. Przed wydzielaniem tych białek do krwi dochodzi do różnorodnych modyfikacji potranslacyjnych. Peptyd sygnałowy i propeptyd to sekwencje regulatorowe zaangażowane w sekrecję i karboksylację białka FIX, które są usuwane z dojrzałej cząsteczki. Domena Gla występuje w czynnikach krzepnięcia zależnych od witaminy K i jest niezbędna dla aktywności FIX oraz jego wiązania do błon fosfolipidowych podczas krzepnięcia krwi (N-końcowa domena Gla w sposób zależny od jonów wapnia). Dodatkowo domena Gla w FIXa przyczynia się do jej wiązania z domeną C2 czynnika krzepnięcia FVIIIa i kolagenem IV. Domeny EGF zawierają dwie domeny podobne — EGF1 (93-129aa) i EGF2 (130-171aa). EGF1 uczestniczy w aktywacji FIX poprzez interakcję z FXIa lub kompleksem czynnik tkankowy/czynnik krzepnięcia VIIa [TF (*tissue factor*)/FVIIa] oraz kofaktorem FVIIIa, a także umożliwia interakcję FIXa z FVIIIa i FX. Domena EGF2 FIXa, ale nie FIX, może być zaangażowana w wiązanie z powierzchnią błony fosfolipidowej płytek krwi, a także z FVIIIa i FX.

Czynnik FIX jest proteazą serynową, która krąży we krwi w postaci nieaktywnego zymogenu. Do aktywacji FIX do FIXa dochodzi w wyniku rozszczepienia proteolitycznego przez FXIa w wewnątrzpochodnym szlaku krzepnięcia bądź przez kompleks TF/FVIIa w szlaku zewnątrzpochodnym, z uwolnieniem peptydu aktywacyjnego. Cząsteczka FIXa zawiera N-końcowy łańcuch lekki (domena Gla i dwie domeny EGF) i C-końcowy łańcuch ciężki (domena SP). Za aktywację FIX odpowiada nie tylko jego cięcie proteolityczne przez FXIa lub kompleks TF/FVIIa, ponieważ aktywność samego FIXa jest zbyt słaba, by rozszczepić FX. Aby uzy-

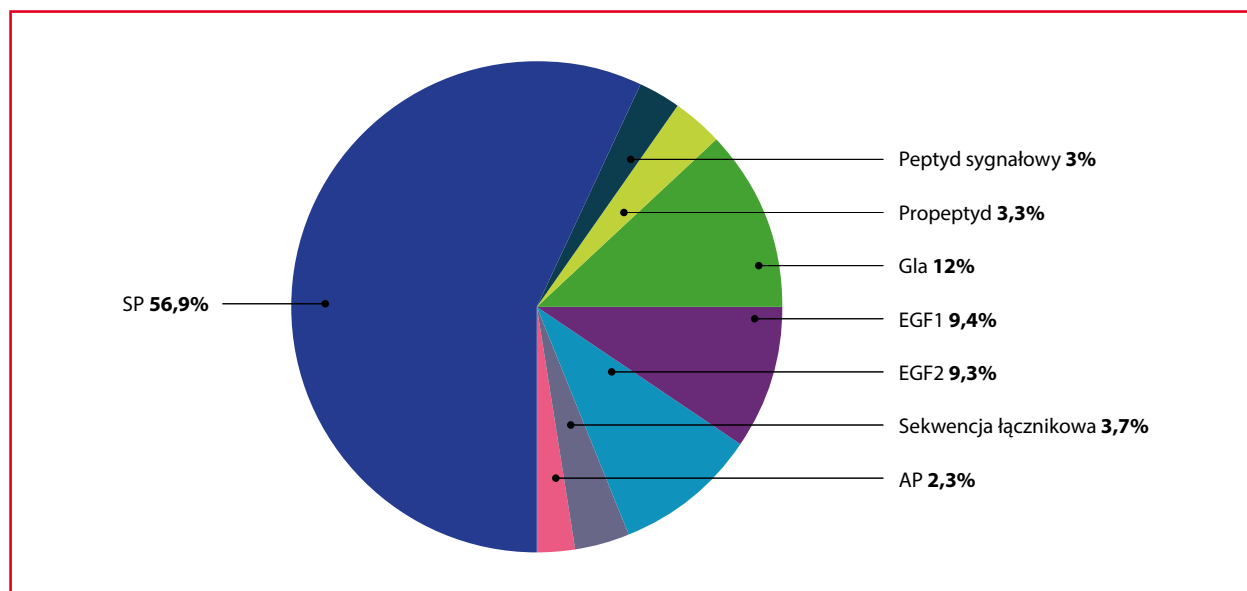
ścić pełną aktywność enzymatyczną, FIXa tworzy kompleks zależny od  $Ca^{2+}$  z kofaktorem FVIIIa na błonach zawierających fosfolipidy, zwany kompleksem tenazy, który zwiększa jego aktywność > 200 000-krotnie.

W interaktywnej bazie danych wariantów genetycznych czynnika FIX (*F9*) — *Factor IX Gene (F9) Variant Database* (<http://www.factorix.org/>) — obecnie zarejestrowanych jest łącznie ponad 1200 unikalnych wariantów *F9* opisanych u 4713 chorych z HB. Mutacje odpowiedzialne za wystąpienie HB występują w regionach kodujących (~80%) i niekodujących (w tym w promotorze, intronach i niepodlegającym translacji regionie 3') genu *F9*.

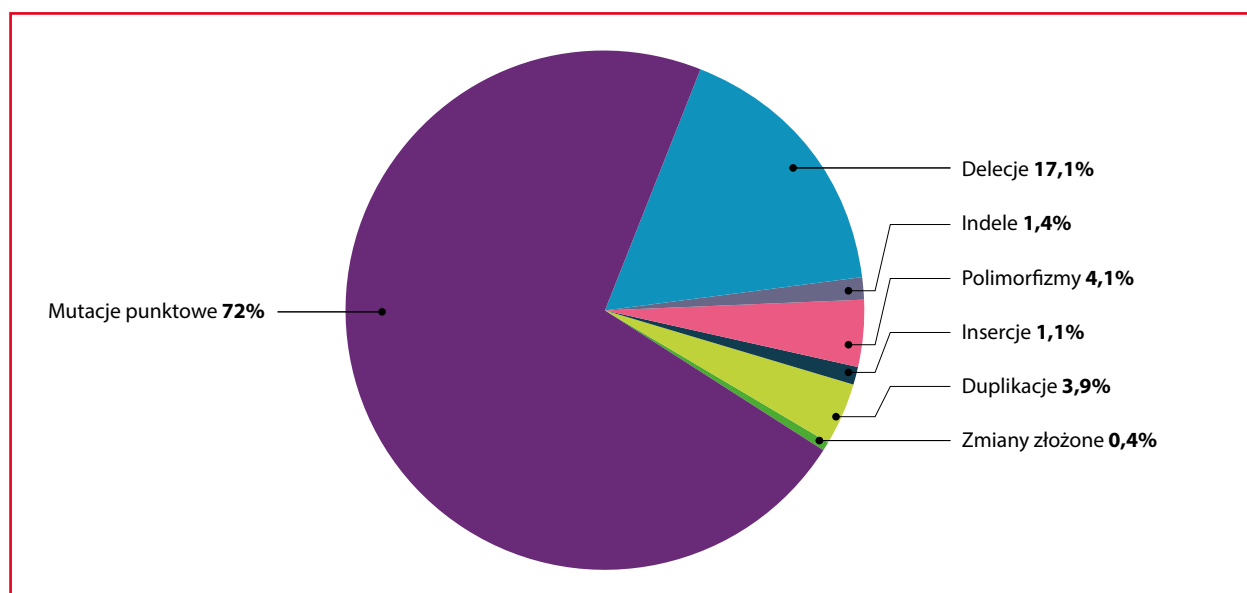
Dodatkowo mutacje zlokalizowane w regionie kodującym występują najliczniej w domenie SP (56,9%), są dość równomiernie rozmieszczone w poszczególnych domenach FIX: Gla (12%), EGF1 (9,4%), EGF2 (9,3%), ale stosunkowo rzadko są wykrywane w peptydzie aktywacyjnym (2,3%) (ryc. 1). Podobnie mutacje regionu niekodującego stanowią rzadziej wykrywaną grupę: peptyd sygnałowy (3%) i propeptyd (3,3%).

Wśród mutacji identyfikowanych w *F9* dominują mutacje punktowe (71,9%), rzadziej identyfikowane są delecje (17,1%), insercje (1,1%), duplikacje (3,9%), indele (1,4%), polimorfizmy (4,1%) i zmiany złożone (0,4%) (ryc. 2). Mutacje sprawcze HB najczęściej wykrywa się w eksonach 2 i 8 genu *F9*, nieco mniejsza jest częstość ich wykrywania w eksonach 4, 5, 6 i 7, a najmniejsza — w eksonach 1 i 3. Większa częstość występowania mutacji w sekwencji eksonów 2 i 8 *F9* sugeruje, że kodowane przez nie domeny cząsteczki FIX, odpowiednio — propeptyd, domena Gla i domena SP, są znacznie ważniejsze dla funkcjonowania FIX w układzie krzepnięcia niż pozostałe.

Mutacje genu *F9* prowadzą do niedoboru FIX poprzez wpływ na jego strukturę, transkrypcję, splicing, translację, modyfikacje potranslacyjne, fałdowanie białka i tworzenie kompleksu funkcjonalnego z innymi czynnikami krzepnięcia. Ponad 70% wykrywanych w *F9* zmian to mutacje punktowe, 17,1% stanowią delecje, 1,1% insercje, 3,9% duplikacje oraz 1,4% indele, wśród których większość powoduje przesunięcie ramki odczytu w sekwencji kodującej (*frame shift*) i syntezę skróconego polipeptydu. Co ważne, pacjenci z mutacjami sekwencji kodującej typu *frame shift* i *inframe* chorują na ciężką postać HB; podobny efekt występuje, jeżeli mutacje tego rodzaju zlokalizowane są we flankujących sekwencjach intronowych, gdyż powoduje to nieprawidłowy splicing i prowadzi do



**Rycina 1.** Rozkład mutacji [dane sumują się do 99,99%, zamiast do 100%] w poszczególnych domenach FIX (wg <https://dbs.eahad.org/>). Opracowano na podstawie [13]. EGF1 (*epidermal growth factor 1*) — domena podobna do naskórkowego czynnika wzrostu 1; EGF2 (*epidermal growth factor 1*) — domena podobna do naskórkowego czynnika wzrostu 2; SP (*serine protease*) — domena proteazy serynowej; AP (*activation peptide*) — peptyd aktywacyjny



**Rycina 2.** Typy mutacji sprawczych HB w genie *F9* (wg <https://dbs.eahad.org/>). Opracowano na podstawie [13]

ciężkiej HB. Około 2% unikalnych mutacji dotyczy wielu regionów genu *F9* i odpowiada dużym, multikesonowym delecjom, które również powodują ciężką HB. Należy podkreślić, że osoby z dużymi delecjami cechują się największym ryzykiem (43%) rozwoju inhibitora FIX. W przypadku chorych z HB spowodowaną mutacjami punktowymi fenotyp krwotoczny jest zróżnicowany — od ciężkiego do łagodnego — i istnieje kilka mechanizmów

powodujących niedobór FIX. Ogólnie rzecz biorąc, mutacje punktowe w regionie promotora powodują HB typu Leiden, mutacje eksonowe powodują w sekwencji DNA zmiany sensu, nonsensowne lub ciche, a zmiany intronowe skutkują nieprawidłowym składaniem transkryptu.

Mutacje w regionie promotorowym genu *F9* często prowadzą do HB typu Leiden, którą po raz pierwszy rozpoznano w 1970 roku. Mężczyźni

z HB typu Leiden charakteryzują się niską FIX:C przy urodzeniu, która wzrasta w okresie dojrzewania, nierzadko osiągając normalny poziom w wieku dorosłym. Zidentyfikowano ponad 20 mutacji *F9* odpowiedzialnych za ten typ HB; są one rozmieszczone w regionie proksymalnego promotora od nukleotydu c.–50 do c.–18 i skupiają się w trzech określonych regionach: c.–34/c.–35, c.–49 i c.–19. Mutacje w nukleotydach c.–34 i c.–35 odpowiadają za ponad połowę przypadków HB typu Leiden. W zależności od mutacji u niektórych pacjentów z HB początkowo występuje ciężki fenotyp, który potem ewoluje do łagodnego, bądź obecny jest wyłącznie fenotyp łagodniejszy. Początkowo uważano, że mechanizm wzrastającej z wiekiem FIX:C jest związany z receptorami androgenowymi, ale do dziś mechanizm ten nie został do końca poznany.

Do bazy wariantów genetycznych *F9* zgłoszono ponad 200 pacjentów z mutacjami punktowymi w intronach, co stanowi około 6% wszystkich chorych (tab. 1). Większość tych mutacji znajdowała się w pobliżu miejsca splicingu (w sekwencji w obrębie 25 pz od eksonu), a mutacje głęboko intronowe były rzadko identyfikowane. Mutacje punktowe zlokalizowane w intronach zwykle prowadzą do nieprawidłowego składania transkryptu, co w konsekwencji wpływa na ekspresję funkcjonalnego białka. Według bazy danych wariantów genetycznych *F9* większość pacjentów z HB z mutacjami intronowymi wykazuje fenotyp krwotoczny ciężki lub umiarkowany, co może świadczyć o możliwym udziale i różnego stopnia zakłócaniu alternatywnego splicingu FIX.

Mutacje zlokalizowane w niepodlegającym translacji regionie 3' zgłoszono w 22 przypadkach HB. Najczęściej identyfikowaną mutacją była c.2545A>G z fenotypem ciężkim lub umiarkowanym, gdyż zmiana ta prowadzi do aktywacji kryptycznego miejsca splicingu, prawdopodobnie destabilizując mRNA lub zmieniając splicing poprzedniego intronu.

Mutacje punktowe występujące w regionach kodujących *F9* stanowią blisko 80% mutacji odpowiedzialnych za HB. Zmiany obejmują 336 reszt aminokwasowych z 461 reszt cząsteczki prekursora FIX i mogą powodować mutacje ciche, nonsensowne i zmiany sensu.

Mutacje synonimiczne, tzw. ciche mutacje, w których dochodzi do zmiany nukleotydu, ale nie kodowanego aminokwasu, w większości wydają się klinicznie neutralne, choć niektóre spośród nich mogą wpływać na produkcję białka z powodu nieprawidłowego splicingu, niestabilności mRNA bądź nieprawidłowej translacji. Z danych zawartych

w bazie wariantów *F9* wynika, że dotychczas zidentyfikowano 16 unikalnych cichych mutacji, jednak ich mechanizmy nie zostały do końca poznane.

Mutacje nonsensowne stanowią około 13% mutacji regionu kodującego i zwykle powodują ciężką postać HB. Chorzy z mutacjami nonsensownymi cechują się zwiększonym ryzykiem rozwoju inhibitora FIX. W grupie pacjentów z mutacjami nonsensownymi znajdują się nieliczne osoby z umiarkowaną lub łagodną HB, co sugeruje możliwą częściową translację pomimo wariantu nonsensownego. Co ciekawe, w osoczu chorych z HB powodowaną wariantami p.Arg294\* i p.Arg298\* ujawniono śladową obecność cząsteczek FIX pełnej długości, co zostało potwierdzone badaniami *in vitro*. Spekuluje się, że odczyt rybosomów w mutacjach nonsensownych, które umożliwiają choćby bardzo niski poziom produkcji białka FIX, ma wpływ zarówno na ciężkość choroby, jak i na prawdopodobieństwo rozwoju inhibitora FIX.

Mutacje zmiany sensu w peptydzie sygnałowym i propeptydzie to stosunkowo rzadkie zmiany. Peptyd sygnałowy i propeptyd są sekwencjami regulatorowymi, które ulegają wycinaniu z dojrzałego łańcucha FIX. Mutacje te powodują niedobór FIX wskutek zaburzonej translokacji FIX do retikulum endoplazmatycznego (np. p.Ile17Asn, p.Leu20Ser, p.Leu23Pro, p.Leu24Pro) lub rozszczepienie peptydu sygnałowego (np. p.Ala26Asp i p.Cys28Arg/Tyr/Trp). W strukturze propeptydu wyróżnia się dwa znaczące elementy: miejsce rozpoznawania GGX i miejsce rozpoznawania propeptydazy. Mutacje sekwencji propeptydu powodują niedobór FIX poprzez zmniejszoną ekspresję, nieprawidłową karboksylację lub zaburzone wydzielanie białka FIX (np. p.Val30Ile, p.Ala37Asp, p.Ala37Thr, p.Ala37Val) bądź też prowadzą do powstania nierozszczepionego propeptydu w dojrzałej cząsteczce FIX (np. p.Arg43Gln, p.Arg43Trp, p.Arg46Ser), co zaburza strukturę domeny GlA.

Domena GlA FIX bierze istotny udział w wiązaniu FIXa z fosfolipidami błonowymi, TF w kompleksie TF/FVIIa oraz domeny C2 FVIIIa, stąd mutacje zmiany sensu zlokalizowane w tym regionie wpływają na enzymatyczną funkcję FIXa. Stanowią one około 12% wykrywanych wariantów *F9*, a spośród 12 zaangażowanych reszt glutaminianu w 9 resztach zostały zgłoszone zmiany patogenne, które w większości dotyczyły chorych z ciężką HB. Mechanizm niedoboru FIX opiera się na zaburzeniu wiązania łańcucha polipeptydowego z jonami Ca<sup>2+</sup> i destabilizacji struktury FIX. Skutkami mutacji punktowych w domenie GlA są zaburzenie strukturalnej integralności tego regionu i osłabienie

Tabela 1. Rozkład mutacji punktowych w poszczególnych regionach F9 (zmodyfikowano wg [8])

| Region F9                           | Typ mutacji               | % wszystkich pacjentów w bazie mutacji F9 |
|-------------------------------------|---------------------------|---|
| Promotor                            | Wywołujące HB typu Leiden | 2   |
|                                     | Zmiany sensu              | 65  |
| Eksony                              | Nonsensowne               | 13  |
|                                     | Synonimiczne (ciche)      | 1   |
| Introny                             | Splicingowe               | 6   |
| Niepodlegający translacji region 3' |                           | 0,6                                       |

interakcji FIX z błoną fosfolipidową, TF, FVIIIa oraz kolagenem IV.

Częstość wykrywania mutacji zmiany sensu w domenach EGF1 i EGF2 jest nieco wyższa od częstości wykrywania zmian w domenie Gla (18,7 vs. 12%). Mutacje typu zmiany sensu cystein (Cys) wiązań dwusiarczkowych stabilizujących domeny EGF powodują ciężką postać HB. Warianty te są związane ze zmniejszonym stężeniem antygenu FIX, co sugeruje destabilizację struktury FIX. Oprócz wiązań dwusiarczkowych wiązanie jonów  $Ca^{2+}$  z domeną EGF1 (reszty Asp93, Gln96 i Asp110) jest niezbędne do stabilizacji jej konformacji i utworzenia kompleksu tenazy na powierzchni fosfolipidów. Mutacje zmiany sensu w tych regionach mogą zaburzać stabilność domeny EGF1, która z kolei odpowiada za prawidłową strukturę domeny SP, niezbędnej dla optymalnej interakcji FIXa z FVIIIa. Mutacje sprawcze HB w domenach EGF, zwłaszcza EGF2 (reszty Ile136, Asn138 i Arg140), mogą zatem zakłócać proces krzepnięcia w wyniku defektywnego wiązania FIXa do FVIIIa. U pacjentów z mutacjami zmiany sensu w resztach Ile136 i Val153 domeny EGF2 może dochodzić do zaburzenia interakcji FIXa z aktywowaną powierzchnią płytek krwi i defektywnego tworzenia kompleksu tenazy, u chorych z mutacjami p.Gly94Arg/Val zaburzona jest zaś interakcja FIX z kompleksem TF/FVIIa.

W bazie wariantów genetycznych F9 opisano ponad 300 chorych z HB z mutacjami w miejscu rozszczepienia peptydu aktywacyjnego, a mianowicie w resztach Arg191 lub Arg226. Zmiany w innych resztach peptydu aktywacyjnego występują rzadko i zwykle są to polimorfizmy. Usunięcie peptydu aktywacyjnego z FIX podczas jego aktywacji wymaga cięć w miejscu zarówno Arg191, jak i Arg226, dlatego w przypadku zmian nukleotydowych w tych aminokwasach proces ten jest zaburzony. Większość pacjentów z mutacjami zmiany sensu w reszcie Arg191 przejawia umiarkowaną

lub łagodną tendencję do krwawień, podczas gdy pacjenci z mutacjami w reszcie Arg226 prezentują fenotyp ciężki. U chorych z mutacjami w resztach Arg191 i Arg226 występują różne stężenia antygenu FIX: w przypadku Arg226 — normalne lub podwyższone, natomiast w przypadku Arg191 — normalne lub umiarkowanie obniżone, co świadczy o szkodliwym wpływie mutacji Arg191 na procesy fałdowania lub sekrecji białka FIX i objawia się występowaniem krwawień o różnym nasileniu u pacjentów z mutacjami Arg191Cys>Leu>Pro>His.

Wśród chorych z HB mutacje zmiany sensu zlokalizowane w domenie SP FIX stanowią blisko 57%, co podkreśla znaczenie tego regionu. Mutacje zmiany sensu w resztach cysteinowych zaangażowanych w tworzenie wiązań dwusiarczkowych w domenie SP i stabilizację białka zwykle są przyczyną ciężkiej postaci HB. Mutacje w resztach Arg294, Arg298 i Asn310 pętli wiążącej jony  $Ca^{2+}$  prowadzą do znaczącego obniżenia stężenia antygenu FIX, co sugeruje, że pętla wapniowa wpływa na stabilność domeny SP. Innym mechanizmem odpowiedzialnym za niedobór FIX jest zaburzona interakcja z FVIIIa wskutek mutacji typu *missense* w zaangażowanym regionie domeny SP (np. helisie 378), gdyż mutacje zmiany sensu w 8/9 reszt w tym regionie powodują HB, zmniejszając powinowactwo FIXa do FVIIIa (reszty Lys339, Asn392, Lys362). Dodatkowo mutacje w triadzie katalitycznej His267, Asp315 i Ser411 domeny SP zaburzają tworzenie miejsca aktywnego lub rozpoznawanie substratu przez FIX.

Hemofilia B jest jedną z najlepiej zbadanych chorób genetycznych w zakresie zaburzeń hemostazy. Dzięki dostępności diagnostyki genetycznej u pacjentów z HB zidentyfikowano już ponad 1000 unikatowych wariantów, choć molekularne mechanizmy niedoboru FIX spowodowanego przez te zmiany nie zostały w pełni poznane. Zróznicowanie fenotypu krwotocznego u chorych z HB w obecności tej samej mutacji sprawczej

wskazuje, że identyfikacja wariantu *F9* nie jest jedynym predyktorem tendencji do krwawień. Poznanie złożoności i zrozumienie mechanizmów molekularnych niedoboru FIX mogą być pomocne w przygotowywaniu nowych strategii precyzyjnego leczenia HB, na przykład w przypadku mutacji nonsensownych obiecujące jest opracowanie leków indukujących odczyt rybosomów, co pozwala na sekrecję pełnej długości FIX, lub opracowanie leków modyfikujących nieprawidłowy splicing.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### Piśmiennictwo

1. Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, et al. Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med J.* 1952; 2(4799): 1378–1382, doi: [10.1136/bmj.2.4799.1378](https://doi.org/10.1136/bmj.2.4799.1378), indexed in Pubmed: [12997790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12997790/).
2. Windyga J. Hemofilie A i B. W: Dmoszyńska A (red.). *Wielka Interna. Hematologia.* Wyd. Medical Tribune Polska, Warszawa; 2011: 608–630.
3. Rosendaal F, Aledort L, Lusher J, et al. Definitions in hemophilia. *Thrombosis and haemostasis.* 2017; 85(03): 560–560, doi: [10.1055/s-0037-1615621](https://doi.org/10.1055/s-0037-1615621).
4. Goodeve AC. Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis. *J Thromb Haemost.* 2015; 13(7): 1184–1195, doi: [10.1111/jth.12958](https://doi.org/10.1111/jth.12958), indexed in Pubmed: [25851415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25851415/).
5. Miller CH. The ical ics of hemophilia B (Factor IX Deficiency). *Appl Clin Genet.* 2021; 14: 445–454, doi: [10.2147/TACG.S288256](https://doi.org/10.2147/TACG.S288256), indexed in Pubmed: [34848993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34848993/).
6. Castaman G, Matino D. Hemophilia A and B: molecular and clinical similarities and differences. *Haematologica.* 2019; 104(9): 1702–1709, doi: [10.3324/haematol.2019.221093](https://doi.org/10.3324/haematol.2019.221093), indexed in Pubmed: [31399527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31399527/).
7. Odnoczko E, Windyga J. Badania genetyczne w diagnostyce hemofilii B. *Hematologia.* 2015; 6(3): 264–270, doi: [10.5603/hem.2015.0038](https://doi.org/10.5603/hem.2015.0038).
8. Shen G, Gao M, Cao Q, et al. The Molecular Basis of FIX Deficiency in Hemophilia B. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(5), doi: [10.3390/ijms23052762](https://doi.org/10.3390/ijms23052762), indexed in Pubmed: [35269902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35269902/).
9. Odnoczko E, Baran B, Windyga J. Z hemostazą na Ty. *BioKsel.*; 2016.
10. Gomez K, Chowdary P. Hemophilia B: molecular basis. W: Christine A. Lee C.A, Berntorp E.E., Hoots K.W. (red). *Textbook of hemophilia.* Willey-Blackwell Wydanie III; 2014: 97–102.
11. Lillicrap, D. The molecular basis of haemophilia B. *Haemophilia.* 1998; 4: 350–357, doi: [10.1046/j.1365-2516.1998.440350.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2516.1998.440350.x), indexed in Pubmed: [9873754](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9873754/).
12. Sidonio RF, Malec L. Hemophilia B (Factor IX Deficiency). *Hematol Oncol Clin North Am.* 2021; 35(6): 1143–1155, doi: [10.1016/j.hoc.2021.07.008](https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.07.008), indexed in Pubmed: [34607716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34607716/).
13. Rallapalli PM, Kembal-Cook G, Tuddenham EG, et al. 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): 1329–1340, doi: [10.1111/jth.12276](https://doi.org/10.1111/jth.12276), indexed in Pubmed: [23617593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23617593/).
14. Saunders RE, O'Connell NM, Lee CA, et al. Factor XI deficiency database: an interactive web database of mutations, phenotypes, and structural analysis tools. *Hum Mutat.* 2005; 26(3): 192–198, doi: [10.1002/humu.20214](https://doi.org/10.1002/humu.20214), indexed in Pubmed: [16086308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16086308/).
15. Tjärnlund-Wolf A, Lassila R. Phenotypic characterization of hemophilia B - Understanding the underlying biology of coagulation factor IX. *Haemophilia.* 2019; 25(4): 567–574, doi: [10.1111/hae.13804](https://doi.org/10.1111/hae.13804), indexed in Pubmed: [31180618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31180618/).
16. Mohammed BM, Matafonov A, Ivanov I, et al. An update on factor XI structure and function. *Thromb Res.* 2018; 161: 94–105, doi: [10.1016/j.thromres.2017.10.008](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2017.10.008), indexed in Pubmed: [29223926](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29223926/).
17. Veltkamp JJ, Meilof J, Remmelts HG, et al. Another genetic variant of haemophilia B: haemophilia B Leyden. *Scand J Haematol.* 1970; 7(2): 82–90, doi: [10.1111/j.1600-0609.1970.tb01873.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1970.tb01873.x), indexed in Pubmed: [5450691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5450691/).
18. Chitlur MB, Lusher JM. Factor IX inhibitors in hemophilia B. W: Christine A. Lee C.A, Berntorp E.E., Hoots K.W. (red). *Textbook of Hemophilia.* Willey-Blackwell Wydanie III; 2014: 103–106.
19. Pinotti M, Caruso P, Canela A, et al. Ribosome readthrough accounts for secreted full-length factor IX in hemophilia B patients with nonsense mutations. *Hum Mutat.* 2012; 33(9): 1373–1376, doi: [10.1002/humu.22120](https://doi.org/10.1002/humu.22120), indexed in Pubmed: [22618954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22618954/).
20. Branchini A, Ferrarese M, Campioni M, et al. Specific factor IX mRNA and protein features favor drug-induced readthrough over recurrent nonsense mutations. *Blood.* 2017; 129(16): 2303–2307, doi: [10.1182/blood-2016-09-738641](https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-738641), indexed in Pubmed: [28196793](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28196793/).