



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η επίδραση του πολυμορφισμού *KLKB1*-G428A (rs3733402)
στο φαινότυπο ασθενών με κληρονομικό αγγειοίδημα**

Γιαννή Παναγιώτα

Εξεταστική επιτροπή:

- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Ανοσολογίας, επιβλέπων
- Σπελέτας Ματθαίος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Κλινικής Μικροβιολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις
Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Οκτώβριος 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

The effect of the *KLKB1*-428G/A (rs3733402) polymorphism on the phenotype of patients with hereditary angioedema

by
Gianni Panagiota

Select committee:

- Germanis Anastasios, Professor of Immunology, Supervisor
- Speletas Mathaios, Associate Professor of Immunology
- Peteinaki Efthimia, Professor of Microbiology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larisa, October, 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» εκπονήθηκε στα εργαστήρια του τεχνοβλαστού CeMIA SA του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Αναστασίου Ε. Γερμενή. Ολοκληρώνοντας την μεταπτυχιακή μου εργασία, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γερμενή για τη βοήθεια, τη στήριξη και την καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα. Για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν ως μέλη της επιτροπής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές κ. Σπελέτα Ματθαίο και Πετεινάκη Ευθυμία.

Ευχαριστώ τους υπευθύνους του εργαστηρίου της CeMIA SA Μαρία Ζαμανάκου και Γεδεών Λουλέ για την καθοδήγηση τους καθώς ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου δουλειάς. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τις διδακτορικές φοιτήτριες Σοφία Βάτσιου και Λουκία Ποταμιάνου για τις πολύτιμες συμβουλές τους, όπως επίσης για την άψογη συνεργασία και την ευχάριστη ατμόσφαιρα καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (ABSTRACT).....	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΙΔΗΜΑ ΜΕ ΕΛΛΕΨΗ C1-INH.....	8
2.1 ΕΠΙΠΤΩΣΗ	8
2.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	9
2.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ C1-INH.....	10
2.4. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ <i>SERPING1</i>	11
2.5 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΟ	12
3. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΙΔΗΜΑ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ FXII (FXII-ΚΑΟ) ΚΑΙ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ (U-ΚΑΟ)	14
4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ ΚΑΟ.....	16
5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΠΑΦΗΣ ΣΤΟ ΚΑΟ.....	19
6. Η ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ	24
7. Ο ΡΟΛΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ KLKB1-428G/A ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ	26
8. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ KLKB1-428G/A.....	27
9. Η ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ ΤΟΥ ΚΑΟ.....	29
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ	31
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	32
2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	32
2.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ 5 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ KLKB1 ΜΕΣΩ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.....	33
2.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	35
2.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ	35
3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	36
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΚΑΟ	Κληρονομικό αγγειοοίδημα
ACE	Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης
ACEi	Αναστολέας του μετατρεπτικού ενζύμου ή κινινάση II
Activated partial thromboplastin time, aPTT	Ενεργοποιημένος χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης
B1 receptor, B1R	Υποδοχέας B1
B2 receptor, B2R	Υποδοχέας B2
BK	Βραδυκινίνη
C1 inhibitor, C1-INH	Αναστολέας της C1 εστεράσης
Cytokeratin 1, CK1	Κυτταροκερατίνη 1
High Molecular Weight Kininogen, HWMK, HK	Υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο
FXII, Factor Hageman	Παράγοντας XII
Factor XII fragment, XIIa	Ενεργοποιημένη μορφή του FXII
Plasmakallikrein, PK	Καλλικρεΐνη πλάσματος
Prekallikrein, Fletcherfactor, PPK	Προκαλλικρεΐνη
Polylcarboxypeptidase, PRCP	Πολυκαρβοξυπεπτιδάση
Receptor of the globular head of C1q, qC1qR	Υποδοχέας της σφαιρικής κεφαλής του μορίου C1q
Tissue Plasminogen Activator, tPA	Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
Urokinase Plasminogen Activator, uPA	Ενεργοποιητής της ουροκινάσης του πλασμινογόνου
Urokinase plasminogen activator receptor, u-PAR	Υποδοχέας του ενεργοποιητή της ουροκινάσης πλασμινογόνου
Aminopeptidase P	Αμινοπεπτιδάση P
Carboxypeptidase N	Καρβοξυπεπτιδάση N
MEA, ACE	Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης
NEP	Ουδέτερη ενδοπεπτιδάση
DPP4	Διπεπτιδυλαμινοπεπτιδάση IV
WKY	Wistar Kyoto Rats
SHR	Spontaneous Hypertensive Rats
PKD	Ανεπάρκεια καλλικρεΐνης πλάσματος
ET-1	Ενδοθηλίνη -1
ADM	Αδρενομεδουλίνη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το C1-INH-KAO αποτελεί ένα νόσημα με μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά τις κλινικές εκδηλώσεις ακόμα και μεταξύ ατόμων τα οποία ανήκουν στην ίδια οικογένεια φέροντας την ίδια μετάλλαξη του γονιδίου *SERPING1*. Οι προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην ανεύρεση μετρήσιμων βιολογικών δεικτών της βαρύτητας της νόσου οι οποίοι μπορούν να συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότερη διαχείριση της. Λαμβάνοντας υπόψη τον κεντρικό ρόλο PK του πλάσματος στην παραγωγή BK, διερευνήθηκε την επίδραση του λειτουργικού πολυμορφισμού *KLKB1*-428G/A στο φαινότυπο της νόσου. Μελετήθηκαν 249 C1-INH-HAE ασθενείς από 114 ευρωπαϊκές οικογένειες και διερευνήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις των κλινικών χαρακτηριστικών του C1-INH-KAO με τη φορεία του πολυμορφισμού *KLKB1*-428G/A, σε συνδυασμό ή όχι με τη φορεία του λειτουργικού πολυμορφισμού *FXII*-46C/T. Οι φορείς του G αλληλομόρφου του πολυμορφισμού *KLKB1*-428G/A επιδεικνύουν αξιοσημείωτη καθυστέρηση στην ηλικία έναρξης της νόσου κατά 4.1 έτη ($P < 0.001$) γεγονός το οποίο εξαρτάται από την κατάσταση ζυγωτίας, ενώ οι ασθενείς φέροντες τους πολυμορφισμούς *KLKB1*-428G/A και *FXII*-46C/T ταυτόχρονα εμφανίζουν καθυστέρηση στην εκδήλωση της νόσου κατά 8.8 έτη ($p < 0.001$) και 64% μειωμένη πιθανότητα για ανάγκη μακροχρόνιας θεραπείας ($p = 0.019$). Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την αρχική υπόθεση πως λειτουργικές τροποποιήσεις σε γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό και τη λειτουργία της BK επηρεάζουν τον κλινικό φαινότυπο και πιθανότατα συνεισφέρουν στην παθογένεια του C1-INH-KAO. Δεδομένου του γεγονότος ότι η έναρξη των συμπτωμάτων σε μικρότερη ηλικία συνδέεται αντιστρόφως με την επακόλουθη πορεία της νόσου και αυξάνει τις πιθανότητες η μακροχρόνια θεραπεία να είναι αναγκαία, αυτοί οι πολυμορφισμοί μπορεί να αποβούν χρήσιμοι ως προγνωστικοί βιοδείκτες της βαρύτητας της νόσου.

ABSTRACT

Background: In view of the large heterogeneity in the clinical presentation of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency (C1-INH-HAE), great efforts are made towards detecting measurable biological determinants of disease severity that can help to improve the management of the disease. Considering the central role that plasma kallikrein plays in bradykinin production, we investigated the contribution of the functional polymorphism *KLKB1*-428G/A in disease phenotype. **Methods:** We studied 249 C1-INH-HAE patients from 114 European families, and we explored possible associations of C1-INH-HAE clinical features with the carriage of *KLKB1*-428G/A, combined or not with that of the functional *FXII*-46C/T polymorphism. **Results:** Carriers of the G allele of the *KLKB1*-428G/A polymorphism exhibited a significantly delayed disease onset by 4.1 years ($P<0.001$) depended on zygosity status, while carriers of both the *KLKB1*-428G/A and the *FXII*-46C/T polymorphism displayed an 8.8-year delay in disease onset ($p<0.001$) and a 64% lower probability to need long-term prophylactic treatment ($p=0.019$). **Conclusions:** These findings support our initial hypothesis that functional alterations in genes of proteins involved in bradykinin metabolism and function affect the clinical phenotype and possibly contribute to the pathogenesis of C1-INH-HAE. Given that an earlier onset of symptoms is inversely correlated with the subsequent course of the disease and, eventually, the need of long-term prophylaxis, these polymorphisms may be helpful prognostic biomarkers of the disease severity.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το αγγειοοίδημα ορίζεται ως το εντοπισμένο και αυτοπεριοριζόμενο οίδημα των υποδόριων και υποβλεννογόνιων ιστών, οφειλόμενο σε παροδική αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας η οποία προκαλείται μέσω της απελευθέρωσης αγγειοδραστικών μεσολαβητών.¹ Η εξέλιξή του μπορεί να είναι είτε οξεία, κυρίως οφειλόμενη σε αλλεργικές ή ψευδοαλλεργικές αντιδράσεις σε τροφές ή φάρμακα, είτε να εμφανίζεται με επαναλαμβανόμενα επεισόδια. Είναι σημαντικός ο διαχωρισμός μεταξύ του αγγειοοιδήματος που παρουσιάζεται με πομφούς το οποίο αποτελεί εκδήλωση κνίδωσης, και στο αγγειοοίδημα χωρίς πομφούς που αποτελεί μια ξεχωριστή οντότητα.² Σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες ταξινόμησης του αγγειοοιδήματος του 2009, το αγγειοοίδημα χωρίς πομφούς μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε κληρονομικό (ΚΑΟ) και επίκτητο (ΕΑΟ). Η γενετική ανεπάρκεια του C1-INH είναι το αίτιο του πιο κοινού τύπου ΚΑΟ.³ Το 2000, οι Bork et al. περιέγραψαν μία μορφή κληρονομικού αγγειοοιδήματος χωρίς ανεπάρκεια C1-INH διευρύνοντας επιπλέον το φάσμα των τύπων αγγειοοιδήματος.⁴ Αναγνωρίστηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο *FXII* σε ορισμένους ασθενείς, οι οποίοι ταξινομούνται στη κατηγορία ασθενών με FXII-ΚΑΟ.⁵ Για τους υπόλοιπους ασθενείς με ΚΑΟ το γενετικό ελάττωμα παραμένει άγνωστο και ταξινομούνται στην κατηγορία ασθενών με U-ΚΑΟ. Οι μη κληρονομούμενες μορφές αγγειοοιδήματος περιλαμβάνουν: 1) την επίκτητη ανεπάρκεια C1-INH, που σχετίζεται κυρίως με αυτοαντισώματα και λεμφοϋπερπλαστικές νόσους,⁶ 2) το αγγειοοίδημα σχετιζόμενο με λήψη αναστολέων μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACEI-ΕΑΟ)⁷ και 3) δύο μορφές ΕΑΟ αγνώστου αιτιολογίας με την ονομασία ιδιοπαθές ισταμινεργικό ΕΑΟ (IH-ΕΑΟ) λόγω της ανταπόκρισης σε αναστολείς H₁-υποδοχέων και ιδιοπαθές μη ισταμινεργικό αγγειοοίδημα (InH-ΕΑΟ).⁸

2. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ C1-INH

2.1 ΕΠΙΠΤΩΣΗ

Το C1-INH-ΚΑΟ είναι μία σπάνια γενετική ασθένεια με εκτιμώμενη επίπτωση 1/10.000–1/100.000 κατοίκους.⁹ Επειδή ευθύνεται μόνο για το 2% όλων των περιπτώσεων αγγειοοιδήματος περιλαμβανομένου και του αγγειοοιδήματος που οφείλεται σε κνίδωση, το ΚΑΟ θεωρείται μια σπάνια οντότητα, η οποία επηρεάζει όλες τις εθνικότητες χωρίς προτίμηση όσον αφορά στο φύλο.¹⁰ Οι ασθενείς άνευ θεραπείας αντιμετωπίζουν επεισόδια κάθε επτά έως δεκατέσσερις ημέρες κατά μέσο όρο, με τη συχνότητα να κυμαίνεται από πολύ σπάνια έως κάθε τρεις ημέρες.¹¹

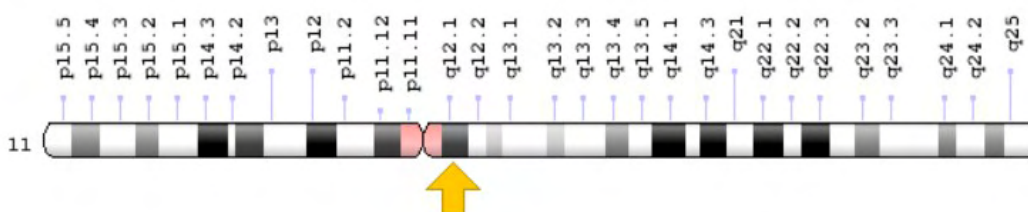
Παρόλο που η ανεπάρκεια C1-INH υπάρχει από τη γέννηση, η εμφάνιση της νόσου συνήθως γίνεται αισθητή κατά την παιδική ηλικία. Οι μισοί από τους ασθενείς εκδηλώνουν το πρώτο επεισόδιο κατά την πρώτη δεκαετία της ζωής τους, και άλλο ένα τρίτο εκδηλώνει την τυπική συμπτωματολογία μέσα στα επόμενα δέκα χρόνια.¹² Εξαιτίας της ατελούς διεισδυτικότητας, 5% των ενηλίκων ασθενών με κληρονομικό αγγειοοίδημα ταυτοποιούνται αφότου κάποιο παιδί τους διαγνωσθεί με τη νόσο, και παρά τη φορεία και μετάδοση της μετάλλαξης στους απογόνους τους, παραμένουν ασυμπτωματικοί καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Ο μωσαϊκισμός των γονάδων έχει περιγραφεί τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες.¹³

Παρά την αυξανόμενη ευαισθητοποίηση της ιατρικής κοινότητας σχετικά με το κληρονομικό αγγειοοίδημα, μελέτες αναφέρουν την κατά μέσο όρο δέκα ετών καθυστέρηση

μεταξύ της έναρξης των συμπτωμάτων και της σωστής διάγνωσης.¹⁴ Μία αμερικανική διαδικτυακή έρευνα η οποία διενεργήθηκε μεταξύ 2009 και 2010 με την ονομασία «Πρόγραμμα επιτήρησης στο ΚΑΟ» κατέληξε σε ένα μέσο όρο που ποικίλει μεταξύ μηδέν και έξι μηνών (5.8%) έως περισσότερο από 10 χρόνια (5.8%) έως τη διάγνωση. Λιγότερο από 38% των ασθενών με κληρονομικό αγγειοοίδημα διαγιγνώσκεται μεταξύ ενός και τριών ετών από την πρωτοεμφάνιση των συμπτωμάτων.¹⁵

2.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Το C1-INH-KAO οφείλεται σε μεταλλάξεις του ενός εκ των δυο αλληλομόρφων του γονιδίου *SERPING1*¹⁶ Η ανίχνευση μεταλλάξεων βασίστηκε αρχικά στην ταυτοποίηση πολυμορφισμών μήκους περιοριστικών τμημάτων και μελέτες διαχωρισμού.

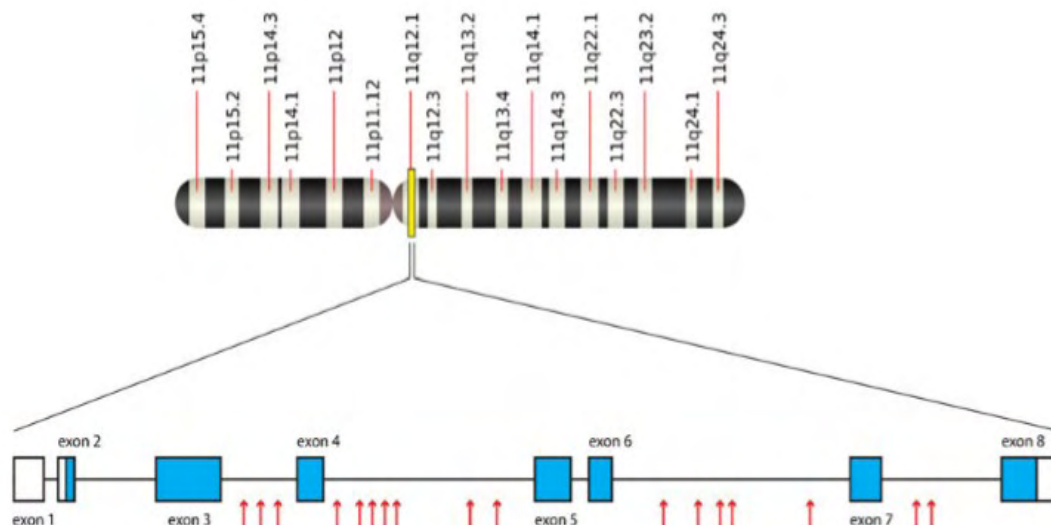


Εικόνα 1. Γονιδιακή Χαρτογράφηση του SERPING1 (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPING1#location>)

Ο C1-INH αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των αναστολέων πρωτεασών σερίνης. Οι σερίνες αποτελούν μια υπερικογένεια πρωτεϊνών μήκους 350–400 αμινοξέων με πλήθος λειτουργιών, οι οποίες περιλαμβάνουν, χωρίς να περιορίζονται σε αυτή, την αναστολή πρωτεασών σερίνης στο μονοπάτι την πήξης του αίματος των σπονδυλωτών.¹⁷ Οι σερίνες συγκεντρώνουν μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον επειδή οι μεταλλάξεις τους προκαλούν έναν αριθμό παθολογικών καταστάσεων, όπως παράδειγμα διαταραχές της πήξης του αίματος, εμφύσημα, κίρρωση, άνοια, πολλές από τις οποίες αποτελούν συνέπεια πολυμερισμού.¹⁸

Το *SERPING1* (OMIM no. 606860; GenBank NM_000062.2) εδράζεται στο χρωμόσωμα 11 στην περιοχή q11.2-q13.1. Απομόνωση γενωμικών κλώνων επέτρεψε αρχικά τον ορισμό των σημείων σύνδεσης εξονίων-ιντρονίων¹⁹ και αργότερα την πλήρη νουκλεοτιδική αλληλουχία του ανθρώπινου C1-INH που περιείχε επιπλέον 1182 bp ακολουθίας προ του εξονίου 1 και 346 bp μετά τη θέση πολυαδενυλίωσης.²⁰ Περιλαμβάνει ένα ασυνήθιστο προαγωγέα χωρίς αλληλουχία TATA αλλά με ένα TdT-ομοιάζων εκκινητή και μια ουρά πολυουρίνης-πυριμιδίνης. Το γονίδιο έχει μέγεθος 17159 bp και δημιουργεί ένα mRNA προϊόν μεγέθους 1827 bp. Αποτελείται από 8 εξόνια και 7 ιντρόνια, το πρώτο περιέχοντας 38 bp μιας μη κωδικής αλληλουχίας και το δεύτερο φέροντας ένα πεπτίδιο σήματος 22bp προ της εναρκτήριας μεθειονίνης. Η μετάφραση αυτής της αλληλουχίας οδηγεί σε μία πρωτεΐνη 478 αμινοξέων, της οποίας το μοριακό βάρος βασιζόμενο μόνο στη σύνθεση των αμινοξέων, υπολογίζεται περίπου στο ήμισυ των 105 kDa που υπολογίζεται για την πρωτεΐνη του πλάσματος.²¹ Ο C1-INH είναι υψηλά γλυκοζυλιωμένος (26-33% της συνολικής μάζας) με έξι θέσεις N-συνδεόμενης γλυκοζυλίωσης και επτά O-συνδεόμενης. Αυτές οι θέσεις βρίσκονται μέσα σε μία έκταση εκατό αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο του μορίου.²² Δεν φαίνεται να σχετίζονται με την πρωτεϊνική λειτουργία, αλλά η απομάκρυνσή τους αυξάνει το ρυθμό καταβολισμού. Το αμινοτελικό άκρο αναπαριστά την ανόμοια με σερίνη περιοχή η οποία είναι υψηλά αποκλίνουσα μεταξύ των

διαφόρων ειδών προτείνοντας ότι επιδέχεται εκτεταμένες μεταβολές στην πρωτογενή ακολουθία όσο και στο πρότυπο γλυκοζυλίωσης.²³



Εικόνα 2. Θέση του γονιδίου *SERPING1* στο χρωμόσωμα 11 και δομή. Οι μαύρες γραμμές αντιπροσωπεύουν τα ιντρόνια, οι λευκοί κύβοι τις αμετάφραστες περιοχές, ενώ τα βέλη τις περιοχές Alu. (Germenis et al. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2016 51 (2): 170-82)

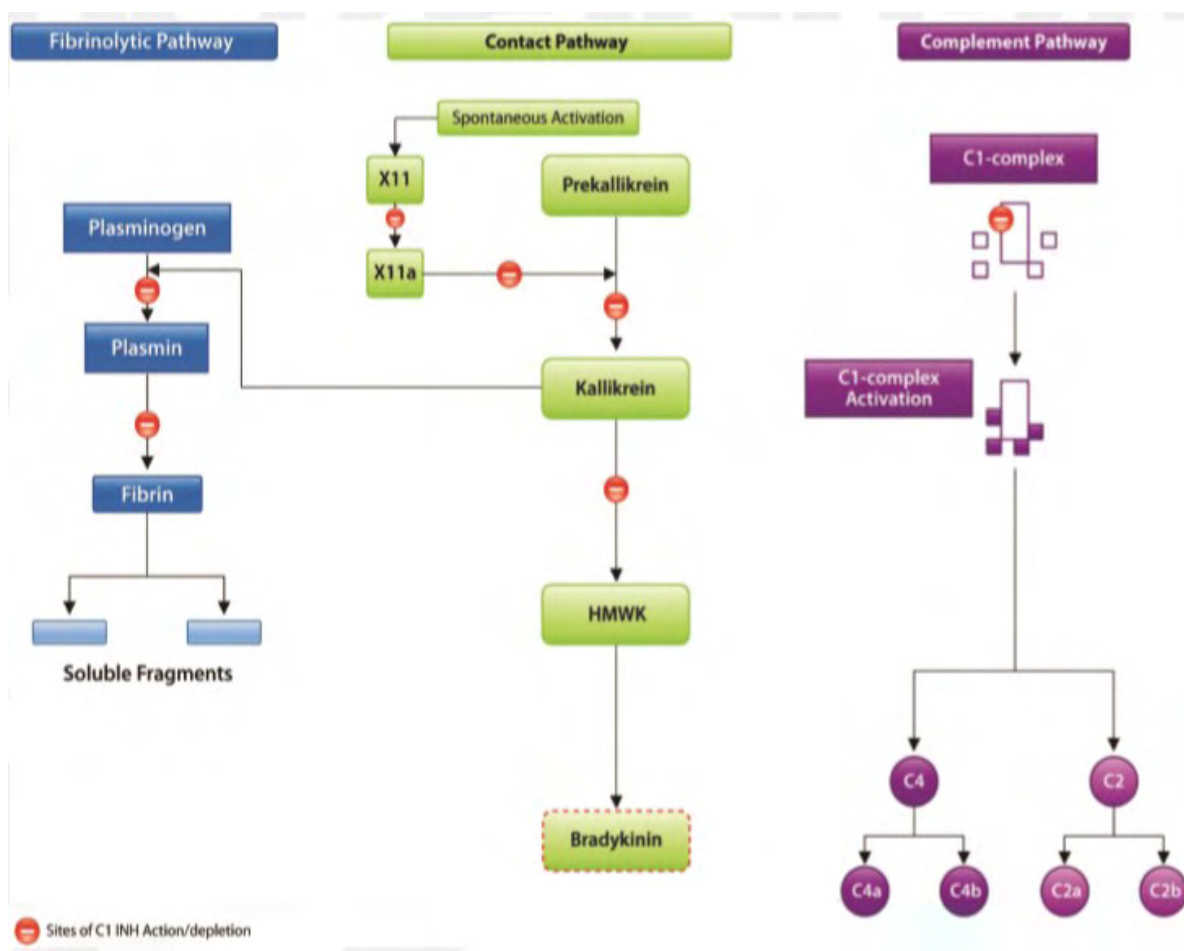
Πίνακας 1. Κύρια χαρακτηριστικά του C1-INH	
Χρωμοσωμική Θέση	q11.2-q13
Γονιαδιακό μέγεθος	17159bp
Μέγεθος mRNA	1827bp
Αριθμός εξονίων-ιντρονίων	8 εξόνια, 7 ιντρόνια
Πρωτεϊνικό μέγεθος	478 αμινοξέα
Μοριακό βάρος	105kDa
Γλυκοζυλίωση	26-33% της συνολικής πρωτεϊνικής μάζας
Ενεργό κέντρο	Αργινίνη 444

Carugati A et al. *Molecular Immunology*.38 2001 161 – 173

2.3 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ C1-INH

Ο C1-INH ανήκει στις σερπίνες, ομάδα αναστολέων πρωτεασών σερίνης και είναι ο κύριος αναστολέας διάφορων πρωτεασών του συμπληρώματος (C1r, C1s, MASP-1, MASP-2) όπως και πρωτεασών του συστήματος επαφής (FXIIa, PK) και ένας ελάχιστον αναστολέας πρωτεασών του συστήματος ινωδόλυσης και πήξης (FXI, πλασμίνη, θρομβίνη).²⁴ Κατά τη διάρκεια κρίσεων ΚΑΟ αυτά τα πρωτεολυτικά μονοπάτια ενεργοποιούνται παράγοντας

διάφορες αγγειοδραστικές ουσίες. Ποντίκια ομόζυγα ως προς την έλλειψη SERPING1 εμφανίζουν έλλειμμα στην αγγειακή διαπερατότητα το οποίο διαμεσολαβείται από τη BK.²⁵



Εικόνα 3. Τα πρωτεολυτικά μονοπάτια επαφής, συμπληρώματος και ινωδόλυσης ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια επεισοδίου ΚΑΟ. Ο C1-INH αποτελεί το υπόστρωμα που καταναλώνεται και οι ασθενείς δεν είναι σε θέση να παράγουν την ποσότητα που απαιτείται για να αντισταθμιστεί η κατανάλωση αυτή. Ως αποτέλεσμα η παραγωγή βραδυκινίνης παραμένει ανεξέλεγκτη προκαλώντας οίδημα. Το σχήμα παρουσιάζει τις υποθετικές θέσεις στις οποίες ο C1INH συμμετέχει σε κάθε μονοπάτι. (Weis M. *Postgraduate Medicine* 2009 Vol 121 Issue 6 p 113-120)

2.4. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ *SERPING1*

Οι μεταλλάξεις του *SERPING1* σε ασθενείς με C1-INH-KAO είναι αρκετά ετερογενείς,²⁶ ενώ το 25% αυτών αποτελούν de novo μεταλλάξεις.²⁷ Το C1-INH-KAO μπορεί να προκληθεί από μεγάλες γονιδιακές ανακατατάξεις, μικροελλείμματα, προσθήκες, σημειακές μεταλλάξεις.²⁸ Οι σημειακές μεταλλάξεις ευθύνονται για την πλειοψηφία των περιπτώσεων ΚΑΟ και μπορεί να έχουν διαφορετικές επιδράσεις. Επιτρέπουν την παραγωγή μη φυσιολογικών μεταγράφων και πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν να παρεμβληθούν στη φαινοτυπική έκφραση της νόσου. Η ομοζυγωτία περιγράφεται σπάνια, και εξαιτίας της χαμηλής συχνότητας των μεταλλάξεων στο γενικό πληθυσμό, εμφανίζεται συχνότερα μετά από αιμομεικτικούς γάμους.²⁹ Παρόλο που οι μεταλλάξεις μπορεί να εντοπίζονται στα εξόνια, στα ιντρόνια ή σε μη κωδικές περιοχές, φαίνεται ότι υπάρχουν συγκεκριμένα «θερμά σημεία» μεταλλάξεων τα οποία κωδικοποιούν αμινοξέα σημαντικά για την πρωτεϊνική λειτουργία.

Συνήθως τα mRNAs που φέρουν πρώιμα κωδικόνια λήξης εξαλείφονται μέσω μη νοηματικής-διαμεσολαβούμενης mRNA αποδόμησης.³⁰ Εάν οι ελλειματικές πρωτεΐνες μεταφραστούν, είναι μη λειτουργικές ή αποδομούνται ταχέως. Υπάρχει μια ασυνήθιστα υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στο εξόνιο 8 το οποίο περιέχει την περιοχή hinge και το ενεργό κέντρο. Το εξόνιο 4 είναι επιρρεπές σε ανακατατάξεις.²⁶ Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο προκύπτουν λόγω των ιντρονίων 3, 4, 6 και 7 τα οποία είναι εξαιρετικά πλούσια σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες Alu που αναπαριστούν «θερμά σημεία» μη ομόλογου ανασυνδυασμού, οδηγώντας σε μερικές ελλείψεις ή διπλασιασμούς του γονιδίου.³¹ Το σύνολο των μεταλλάξεων που έχουν περιγραφεί έχει συλλεχθεί σε γενετικές βάσεις δεδομένων (OMIM ID 106100, Human Gene Mutation Database 119041) και σε βάση ειδική για το νόσημα (<http://hae.enzim.hu>).³²

Οι μεταλλάξεις του *SERPING1* οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα C1-INH και αποσταθεροποίηση του συστήματος επαφής με αυξημένη απελευθέρωση BK, η οποία θεωρείται ο κύριος μεσολαβητής του αγγειοοιδήματος. Δύο φαινοτυπικές παραλλαγές έχουν περιγραφεί. Κλινικά οι τύποι I και II είναι δυσδιάκριτοι. Ο τύπος I αντιπροσωπεύει το 85% των περιπτώσεων και χαρακτηρίζεται από ποσοτική μείωση του C1-INH, η οποία οδηγεί σε μειωμένη λειτουργική δραστηριότητα και ο τύπος 2 χαρακτηρίζεται από φυσιολογικά ή και αυξημένα επίπεδα C1-INH, ο οποίος είναι όμως δυσλειτουργικός.³³ Ο τύπος II οφείλεται σε μια σημειακή μετάλλαξη στην περιοχή της θηλιάς του ενεργού κέντρου. Το ενεργό κέντρο κωδικοποιείται από το εξόνιο 8 το οποίο είναι πλούσιο σε αλληλουχίες CpG, οι οποίες εμφανίζουν τάση προς αυτόματη απαμίνωση. Η πιο κοινή αιτία του αγγειοοιδήματος τύπου II είναι η αντικατάσταση της αργινίνης 444, στο ενεργό κέντρο. Μεταλλάξεις κάτωθεν του ενεργού κέντρου μπορεί να οδηγήσουν σε πρωτεϊνικά προϊόντα τα οποία παραμένουν ενδοκυττάρια.³⁴ Συγκεντρωτικά, το γενετικό έλλειμμα του C1-INH αναπαριστά μία πολύπλοκη κατάσταση στην οποία σχεδόν κάθε οικογένεια φέρει τη δική της μετάλλαξη και αυτή η μετάλλαξη μπορεί να έχει όλες τις πιθανές συνέπειες, από αναστολή της μεταγραφής έως παραγωγή πρωτεϊνών με υπολλειπόμενη ανασταλτική δράση.

2.5 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΟ

Η διάγνωση εκτός από την τυπική συμπτωματολογία απαιτεί εργαστηριακή επιβεβαίωση.³ Οι ασθενείς παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα C4, και σε μικρότερο ποσοστό C2, λόγω κατανάλωσης τους εξαιτίας της ενεργοποίησης της κλασικής οδού του συμπληρώματος οφειλόμενης στην έλλειψη του C1-INH. Ο προσδιορισμός των επιπέδων C4 χρησιμοποιείται στην ανίχνευση του C1-INH-HAE καθώς παραμένουν χαμηλά ακόμα και μεταξύ των μεσοδιαστημάτων των κρίσεων ενώ κατ' εξαίρεση σε ένα ποσοστό περίπου 2% ανευρίσκονται φυσιολογικά.³⁵ Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με επίπεδα C1-INH κάτω του 50% της φυσιολογικής τιμής.³⁶ Τα επίπεδα του C1-INH κυμαίνονται μεταξύ 5-30% του φυσιολογικού, σε σχέση με το αναμενόμενο 50% για ένα αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Η μερική καταστολή της έκφρασης του φυσιολογικού mRNA, όσο και η αυξημένη κατανάλωση του C1-INH θα μπορούσαν να εξηγήσουν τα χαμηλότερα του αναμενόμενου επίπεδα C1-INH στο πλάσμα σε ετερόζυγους ασθενείς.

Περίπου το 15% των ασθενών διαθέτουν φυσιολογικά επίπεδα C1-INH στο πλάσμα. Για αυτή την ομάδα ασθενών, η διάγνωση απαιτεί τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του C1-INH στο πλάσμα. Δύο μέθοδοι (χρωμογενική και ανοσοενζυμική) βασισμένες στον προσδιορισμό της ικανότητας του πλάσματος να αναστέλλει τη δραστηριότητα εστεράσης μίας σταθερής

ποσότητας C1s, είναι διαθέσιμες.³⁷ Η χρωμογενική μέθοδος συνήθως προτιμάται χάρη στην υψηλότερη θετική προγνωστική αξία. Η διάγνωση του C1-INH-KAO, προτείνεται από τους ειδικούς, να βασίζεται σε δύο μετρήσεις μειωμένου C4 και ποσοτικού ή/και λειτουργικού C1-INH, με διαφορά ενός έως τριών μηνών.³⁸ Η χρήση μειωμένων επιπέδων C4 σε συνδυασμό με μειωμένη δραστηριότητα εμφανίζει ειδικότητα 98–100% και αρνητική προγνωστική αξία της τάξεως του 96%.³⁹ Ένα φυσιολογικό αποτέλεσμα επιπέδων C4 και λειτουργικότητας C1-INH αποκλείει τους τύπους I και II αλλά δεν αποκλείει το κληρονομικό αγγειοοίδημα με φυσιολογικό C1-INH.⁴⁰

Πίνακας 2. Κριτήρια διάγνωσης του ΚΑΟ

Η διάγνωση τεκμηριώνεται με ένα κλινικό και ένα εργαστηριακό κριτήριο. Όταν το οικογενειακό ιστορικό αποτελεί το κλινικό κριτήριο, πρόκειται για ένα ασυμπτωματικό φορέα ΚΑΟ

Κλινικά κριτήρια

- Επαναλαμβανόμενο υποδόριο αγγειοοίδημα το οποίο είναι μη κνιδωτικό, μη ερυθματώδες, αυτοπεριοριζόμενο και συνήθως διαρκεί πάνω από 12 ώρες χωρίς σημαντική κνίδωση
- Ανεξήγητο, υποτροπιάζον κοιλιακό άλγος συχνά συνοδευόμενο από εμέτους και διάρροιες, το οποίο υποχωρεί αυθόρμητα σε 42 με 76 ώρες
- Επαναλαμβανόμενο στοματικό, φαρυγγικό ή λαρυγγικό οίδημα
- Τεκμηριωμένο οικογενειακό ιστορικό ΚΑΟ

Εργαστηριακά κριτήρια

- Αντιγονικές συγκεντρώσεις C1INH <50% του φυσιολογικού σε δύο διακριτές μετρήσεις μετά το πρώτο έτος της ζωής
- Λειτουργικά επίπεδα C1INH <50% (χρωμογενική μέθοδος) ή <84% (Elisa) του φυσιολογικού σε δύο διακριτές μετρήσεις μετά το πρώτο έτος της ζωής
- Μετάλλαξη στο γονίδιο του C1INH που τροποποιεί την πρωτεϊνική σύνθεση ή λειτουργία

Longhurst H, Cicardi M. Hereditary angio-oedema. Lancet 2012; 379: 474–81

Ο προγεννητικός έλεγχος για το κληρονομικό αγγειοοίδημα ζητείται σπάνια και ενδείκνυται μόνο εφόσον η μετάλλαξη του προσβεβλημένου γονέα είναι γνωστή.³⁸ Γενικά θεωρείται μη πρακτική η ανίχνευση του ΚΑΟ σε προγεννητικό στάδιο διότι η μετάλλαξη δεν ανιχνεύεται πάντα, η ίδια μετάλλαξη μπορεί να σχετίζεται με διαφορετικούς φαινοτύπους και η βαρύτητα της νόσου δεν είναι προβλέψιμη. Για νεογνά με προσβεβλημένο γονέα η δοκιμασία ποσοτικού και λειτουργικού C1-INH πραγματοποιείται αρχικά στην ηλικία των 6 μηνών ή αργότερα, όταν τα επίπεδα του συμπληρώματος φθάνουν τυπικά εκείνα του ενηλίκου.⁴¹ Εφόσον ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν σε νεογνά κάτω του ενός έτους, επαναληπτικός έλεγχος σε μεγαλύτερη ηλικία συστήνεται για επιβεβαίωση της διάγνωσης. Τα επίπεδα του C4 φθάνουν τυπικά εκείνα του ενηλίκου στην ηλικία μεταξύ 2 και 3 ετών.⁴² Ο γενετικός έλεγχος μπορεί να αποβεί χρήσιμος στην επιβεβαίωση της διάγνωσης σε ασυμπτωματικά παιδιά των οποίων οι δοκιμασίες για τον C1-INH και C4 είναι αμφιλεγόμενες.⁴¹

Η γενετική ανάλυση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη κατά το πρώτο έτος της ζωής όπου τα επίπεδα C1-INH στο πλάσμα μπορεί να είναι ψευδώς χαμηλά ώστε να διακριθεί το επίκτητο C1-INH αγγειοοίδημα όταν η διάγνωση δεν είναι ξεκάθαρη.³⁸ Η ετερογένεια των μεταλλάξεων που αφορούν το C1-INH-KAO κάνει τη γενετική διάγνωση σχετικά περίπλοκη.

3. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΟΥ FXII (FXII-KAO) ΚΑΙ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ (U-KAO)

Το 1985 παρατηρήθηκε μία οικογένεια στην οποία πέντε γυναίκες έπασχαν από επαναλαμβανόμενα επεισόδια δερματικού αγγειοοιδήματος, κοιλιακού άλγους και απόφραξης ανώτερων αναπνευστικών οδών.⁴ Όλες διέθεταν φυσιολογικά λειτουργικά επίπεδα C1-INH. Αργότερα, ανακαλύφθηκαν εννέα επιπλέον οικογένειες στις οποίες οι γυναίκες εμφάνιζαν παρόμοια συμπτωματολογία με φυσιολογικό C1-INH. Θεωρήθηκε ότι αυτός ο τύπος της νόσου αφορά αποκλειστικά το γυναικείο πληθυσμό και προτάθηκε ο όρος «Κληρονομικό αγγειοοίδημα με φυσιολογικό C1-INH».⁴³ Στην πορεία βέβαια, αποδείχθηκε η κληρονόμησή του σπανιότερα σε μέλη του ανδρικού πληθυσμού.⁴⁴

Μία υποομάδα ασθενών με κληρονομικό αγγειοοίδημα και φυσιολογικά επίπεδα C1-INH έχει αναγνωρισθεί χάρη στην ύπαρξη δυο διαφορετικών παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων οι οποίες θεωρήθηκαν ως αιτία της νόσου.⁴⁵ Οι ασθενείς αυτοί ταξινομούνται στην κατηγορία των ασθενών με κληρονομικό αγγειοοίδημα που οφείλεται σε μεταλλάξεις του FXII (FXII-KAO). Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται και ασθενείς με μεταλλάξεις του FXII ακόμα και χωρίς γνωστό ιστορικό νόσου στην οικογένεια. Οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στην ίδια περιοχή του χρωμοσώματος 5, q33 όπου εδράζεται το γονίδιο του παράγοντα Hageman, ή παράγοντα πήξεως XII (Online Mendelian Inheritance in Man # 610619).⁴⁶ Οι μεταλλάξεις του FXII κληρονομούνται ως αυτοσωμικό επικρατές χαρακτηριστικό με χαμηλή διεισδυτικότητα. Οι ασυμπτωματικοί φορείς αποτελούν >90% στους άνδρες και περίπου το 40% στις γυναίκες.⁴⁷ Ο FXII είναι μία πρόδρομη πρωτεάση σερίνης που παράγεται και εκκρίνεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα και εμπλέκεται στην έναρξη του ενδογενούς μονοπατιού της πήξης, στην ινωδόλυση, την παραγωγή BK και στο σύστημα συμπληρώματος. Αποτελείται από μία καρβοξυτελική καταλυτική υπομονάδα, δύο υπομονάδες τύπου φιβρονεκτίνης, μία υπομονάδα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και μία kringle υπομονάδα, η οποία ανευρίσκεται στις περισσότερες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σύστημα ινωδόλυσης.⁴⁸ Το γονίδιο καλύπτει μία περιοχή 12kb και αποτελείται από 14 εξόνια.⁴⁹ Η μεταγραφή του γονιδίου ξεκινά 49 βάσεις προ του κωδικονίου έναρξης. Οι πρώτες μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και εμφανίζουν ατελή διεισδυτικότητα. Αφορούν στο εξόνιο 9 και συγκεκριμένα την αντικατάστη θρεονίνης σε λυσίνη (Thr328Lys) και την αντικατάσταση θρεονίνης σε αργινίνη (Thr328Arg). Επιπλέον, έχει περιγραφεί ένα μεγάλο έλλειμμα 72 ζευγών βάσεων (c.971_1018 + 24del72) και ένας διπλασιασμός 18 ζευγών βάσεων (c.892_909dup) στην ίδια περιοχή του F12.^{50,51} Η ανακάλυψη των μεταλλάξεων του FXII σε μια υποομάδα ασθενών με κληρονομικό αγγειοοίδημα και φυσιολογικό C1-INH οδήγησε σε ένα υποθετικό αιτιολογικό μηχανισμό του αγγειοοιδήματος, ο οποίος είναι το πιθανό κέρδος λειτουργικότητας του παράγοντα οδηγώντας σε υπερενεργοποίηση του συστήματος συμπληρώματος και αυξημένη απελευθέρωση BK.⁵² Παρόλα αυτά μια επακόλουθη μελέτη επικεντρωμένη στην επιβεβαίωση αυτού του μηχανισμού απέτυχε να αποδείξει την υπερενεργοποίηση του καταρράκτη FXII-PK-BK.⁵³ Έτσι, τα τρέχοντα μηχανιστικά δεδομένα είναι αντιφατικά και η σημασία των μεταλλάξεων του FXII στην παθογένεση της νόσου ασαφής. Αξίζει να σημειωθεί πως οι

μεταλλάξεις του παράγοντα που έχουν περιγραφεί φαίνονται πιο επικρατείς στον ευρωπαϊκό πληθυσμό. Στην Αμερική οι μεταλλάξεις του FXII είναι εξαιρετικά σπάνιες στον πληθυσμό που έχει μελετηθεί. Η συμπτωματολογία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενο οίδημα δέρματος, κρίσεις κοιλιακού άλγους, οίδημα γλώσσας και των ανώτερων αεροφόρων οδών ανεξάρτητα από το είδος της μετάλλαξης στον FXII. Κνίδωση δεν εμφανίζεται στους ασθενείς αυτούς ενώ τα συμπτώματα διαρκούν από δύο έως πέντε ημέρες προσβάλλοντας κυρίως τα άκρα και το πρόσωπο.⁵²

Οι ασθενείς με φυσιολογικό C1-INH και απροσδιόριστο γενετικό έλλειμμα αποτελούν την κατηγορία των ασθενών με U-KAO.⁵⁴ Σε μια συγκεντρωτική μελέτη 138 ασθενών με nC1-INH-KAO, η πλειοψηφία είχε συμπτώματα δερματικού οιδήματος (92.8%), οιδήματος προσώπου (53.6%) και κοιλιακής προσβολής (50%). Το οίδημα λάρυγγα (25.4%) και σταφυλής (21.7%) ήταν επίσης συχνά, ενώ το οίδημα άλλων οργάνων σπάνιο (3.6%). Σε πολλές γυναίκες η συμπτωματολογία εκλυόταν με τη χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών, θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης ή εγκυμοσύνη.⁵⁴ Η διάγνωση του U-KAO βασίζεται καθαρά σε κλινικά κριτήρια και απαιτεί οι ασθενείς να διαθέτουν: 1) τα προαναφερόμενα συμπτώματα, 1) ένα ή παραπάνω οικογενειακά μέλη με την ίδια συμπτωματολογία, 3) αποκλεισμό οικογενούς και κληρονομικής κνίδωσης, 4) φυσιολογικά επίπεδα ποσοτικού και λειτουργικού C1-INH και 5) απουσία μετάλλαξης στον FXII σχετιζόμενη με αγγειοοίδημα. Στους ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία nC1-INH-KAO έχει ανιχνευθεί πρόσφατα μετάλλαξη στο γονίδιο του πλασμινογόνου (*PLG*). Η μετάλλαξη c.9886A>G βρίσκεται στο εξόνιο 9 και οδηγεί στην παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη p.Lys330Glu στην περιοχή kringle 3. Η μετάλλαξη πιθανόν οδηγεί σε δομικές αλλαγές που τροποποιούν τη λειτουργία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης PLG. Ίσως προσδίδει μεγαλύτερη συγγένεια για επιφάνειες ή/και να την καθιστά πιο προσβάσιμη σε ενεργοποιητές όπως οι tPA και uPA. Οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν οίδημα προσώπου/χειλέων (78.3%) και γλώσσας (78.3%). 8.7% των οιδημάτων γλώσσας συσχετίστηκαν με δύσπνοια, αλλαγές φωνής ενώ δύο ασθενείς είχαν καταλήξει λόγω ασφυξίας.⁵⁵ Επιπλέον, πρόσφατα η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο της αγγειοποιητίνης-1, *ANGPT1* πιθανόν οδηγεί σε τροποποίηση της αγγειακής διαπερατότητας προκαλώντας υποτροπιάζον αγγειοοίδημα το οποίο μεσολαβείται από BK όπως και οι άλλοι τύποι ΚΑΟ.⁵⁶ Στοχεύει μηχανισμούς κλειδιά που συνεισφέρουν στη διατήρηση του ενδοθηλιακού φραγμού, αναστέλλοντας τις επιδράσεις παραγόντων μεταξύ των οποίων είναι και ο VEGF.⁵⁷ Η μετάλλαξη στη θέση p.119 βρίσκεται στο τέλος μιας περιοχής η οποία θεωρείται κρίσιμη για τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης *ANGPT1*.⁵⁸ Η αντικατάσταση ενός υδρόφιλου από ένα υδρόφοβο κατάλοιπο προτείνεται ότι αλλάζει την πρωτεϊνική δομή επιδρώντας σημαντικά στη λειτουργικότητα. Ποσοτική ανάλυση αποκάλυψε μείωση στις πολυμερικές μορφές και μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της *ANGPT1* στους ασθενείς που φέρουν τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη συγκριτικά με υγιείς συγγενείς. Μεταλλαγμένες σειρές HEK293 κυττάρων τα οποία είτε εκφράζουν την *ANGPT1* αγρίου τύπου, είτε τρία διαφορετικά μεταλλάγματα, έδειξαν ότι η μετάλλαξη p.A119S οδηγεί σε ποσοτική μείωση των πολυμερών περίπου κατά το ένα τρίτο.⁵⁹

Η συμπτωματολογία του nC1-INH-KAO είναι παρόμοια με εκείνη της ανεπάρκειας C1-INH, και η απουσία κνίδωσης και ανταπόκρισης των συμπτωμάτων στα αντισταμινικά/κορτικοστεροειδή υποστηρίζουν μια μη-ισταμινεργική διεργασία. Τα οιστρογόνα είναι γνωστό ότι ενισχύουν την ενεργοποίηση του συστήματος PK-BK,⁶⁰ και επιδεινώνουν τις εκδηλώσεις της νόσου στους ασθενείς με nC1-INH-KAO.⁶¹ Η παρατήρηση ότι οι περισσότεροι ασθενείς με nC1-INH-KAO είναι γυναίκες οι οποίες εμφανίζουν αρχικά τα συμπτώματα μετά την εφηβεία

προτείνει ένα πιθανό ρόλο για τα οιστρογόνα στην παθογένεια της νόσου. Ο διαχωρισμός οιστρογονοεξαρτώμενου και μη οιστρογονοεξαρτώμενου αγγειοιδήματος υποστηρίζεται από την προαναφερόμενη επιδείνωση της συμπτωματολογίας σε καταστάσεις αυξημένων οιστρογόνων εξαιτίας εξωγενούς χορήγησης ή ενδογενούς παραγωγής.¹⁵ Όμως η έναρξη των συμπτωμάτων σε μερικές γυναίκες προεφηβικής ηλικίας, η επιμονή της νόσου μετά την εμμηνόπαυση και η παρουσία της ασθένειας σπανίως σε άνδρες προτείνουν ότι η νόσος δεν είναι οιστρογονοεξαρτώμενη, αλλά ότι η ορμόνη είναι ένας ισχυρός συμπαράγοντας στην φαινοτυπική έκφραση.⁶²

4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ ΚΑΟ

Οι κρίσεις του ΚΑΟ συνήθως ακολουθούν μια προκαθορισμένη πορεία. Πολλά επεισόδια προμηνύονται από ένα πρόδρομο σύμπτωμα, συνήθως αίσθηση νυγμού, αίσθηση τάσης, θερμότητας, καύσου ή κνησμού στην προσβεβλημένη περιοχή. Τα πρόδρομα συμπτώματα είναι πιθανό να εμφανιστούν μερικές μέρες πριν την εκδήλωση της κρίσης και περιλαμβάνουν αυξημένη κόπωση, καταβολή, ναυτία, κοιλιακή διάταση, μετεωρισμό ή αυξημένη όρεξη ιδιαίτερα πριν από γαστρεντερική κρίση.⁶³ Το πιο χαρακτηριστικό πρόδρομο σύμπτωμα περίπου στο 1/3 των πρόδρομων εκδηλώσεων είναι το παρυφώδες ερύθημα (erythema marginatum) ένα ψηλαφητό, ερπητοειδές, μη κνιδωτικό εξάνθημα σε κορμό, άνω ή κάτω άκρα, σπανιότερα στο πρόσωπο.⁶⁴

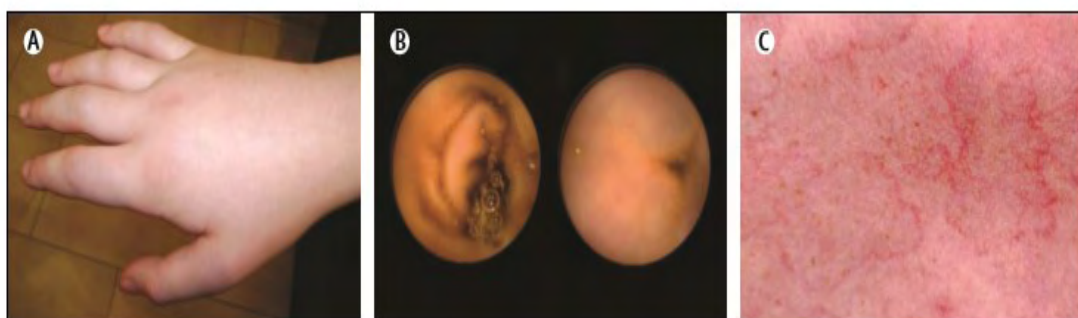


Εικόνα 4. Παρυφώδες ερύθημα στο άνω άκρο ασθενούς με ΚΑΟ. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι βλάβες δεν είναι επηρμένες ούτε κνιδωτικές. (Gower RG et al. *World Allergy Organization Journal* 2011 4(2), S9-S21)

Σε αντίθεση με την κνίδωση, το ΚΑΟ επηρεάζει τις βαθύτερες στοιβάδες του δέρματος. Εκδηλώνεται κλινικά με επαναλαμβανόμενο, εντοπισμένο υποδόριο ή υποβλεννογόνιο οίδημα. Αν και μερικές φορές εμφανίζεται ταχέως, το οίδημα τυπικά επιδεινώνεται αργά αλλά προοδευτικά μέσα στις πρώτες 24 ώρες, μπορεί να επιμείνει για δύο έως πέντε ημέρες και συνήθως ξεκινά να υποχωρεί σταδιακά μέσα στις επόμενες 48 με 72 ώρες.⁶⁵ Οι ασθενείς τείνουν να εμφανίζουν επαναλαμβανόμενα επεισόδια με μεσοδιαστήματα ύφεσης, προτείνοντας ότι οι κρίσεις πυροδοτούνται από διακριτά ερεθίσματα, παρόλο που στους περισσότερους το αίτιο δεν είναι προσδιορίσιμο. Τα κοινότερα ερεθίσματα είναι ο τοπικός τραυματισμός, (περιλαμβανομένου ιατρικών και οδοντιατρικών παρεμβάσεων), συναισθηματική καταπόνηση και οξεία λοίμωξη. Η βαρύτητα της νόσου μπορεί να επιδεινωθεί εξαιτίας της εμμήνου ρύσεως, αντισυλληπτικών σκευασμάτων περιέχοντα οιστρογόνα, θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης, αναστολέων μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACEi) και μη στεροειδών

αντιφλεγμονωδών.⁶⁶ Η εγκυμοσύνη έχει μεταβλητή επίδραση στη βαρύτητα της νόσου, αλλά οι κρίσεις είναι σπάνιες κατά τη γέννηση. Οι ασθενείς με ΚΑΟ έμφανίζουν αυξημένη συχνότητα αυτοάνοσων νοσημάτων, ειδικά σπειραματονεφρίτιδας.⁶⁷

Τα συχνότερα εμπλεκόμενα όργανα περιλαμβάνουν το δέρμα, τους ανώτερους αεραγωγούς και το γαστρεντερικό σωλήνα. Οι κρίσεις μπορεί να ξεκινήσουν από μια περιοχή και να επεκταθούν σε άλλη πριν υποχωρήσουν. Οι προσβολές των άκρων επηρεάζουν το 96% των ασθενών και μπορεί να είναι παραμορφωτικές και επιβαρυντικές.¹¹ Σχεδόν οι μισές κρίσεις περιλαμβάνουν το γαστρεντερικό σύστημα και όλοι οι ασθενείς εμφανίζουν τουλάχιστον ένα επεισόδιο κοιλιακού άλγους οφειλόμενο σε παροδική απόφραξη του εντέρου λόγω βλεννογόνιου οιδήματος. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν οξύ κοιλιακό πόνο, ναυτία, εμέτους και διάρροιες. Οι γαστρεντερικές κρίσεις ευθύνονται για πολλές επισκέψεις στο τμήμα επειγόντων και νοσηλείες. Το αγγειοοίδημα του γαστρεντερικού σωλήνα μπορεί να οδηγήσει σε αγγειοδιαστολή και εξαγγείωση πλάσματος αρκετή να προκαλέσει υποογκαιμική καταπληξία. Το αγγειοοίδημα του εντέρου μπορεί να συμβεί εν απουσία δερματικών εκδηλώσεων και μπορεί εύκολα να διεγνωσθεί λανθασμένα εκτός και αν ο γιατρός έχει την επίγνωση ώστε να συμπεριλάβει το ΚΑΟ στη διαφορική διάγνωση.⁶⁸



Εικόνα 5.Κλινικές εκδηλώσεις του ΚΑΟ. (Α) Αγγειοοίδημα του χεριού σε ασθενή με ΚΑΟ. (Β) Ενδοσκόπηση με κάψουλα κατά τη διάρκεια κοιλιακής προσβολής σε ασθενή με ΚΑΟ, παρουσιάζοντας αυλό με φυσιολογικό βλεννογόνο (αριστερά) και οιδηματώδη μειωμένης διαμέτρου αυλό, προκαλώντας μερική εντερική απόφραξη (δεξιά).(C) Παρυφώδες ερύθημα στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα ασθενούς με ΚΑΟ, 8 ώρες πριν από την έναρξη των κοιλιακών συμπτωμάτων.(Longhurst H,Cicardi M.*Lancet* 2012;379:474–81)

Σχεδόν οι μισοί ασθενείς εκδηλώνουν κρίση λαρυγγικού οιδήματος κατά τη διάρκεια της ζωής.¹¹ Η συμπτωματολογία της λαρυγγικής προσβολής περιλαμβάνει αλλοιώσεις στη φωνή, βράγχος, δυσκαταποσία, δύσπνοια και συριγμό. Εάν δεν διαχειριστεί αποτελεσματικά, μπορεί να εξελιχθεί σε ασφυξία. Η εξασφάλιση του αεραγωγού μπορεί να αποβεί σωτήρια στην απουσία αποτελεσματικής θεραπείας, όμως το εκτεταμένο οίδημα των ανώτερων αγωγών μπορεί να κάνει τη διασωλήνωση εξαιρετικά δύσκολη. Έχει αναφερθεί βάσει ερευνών, 40% επίπτωση ασφυξίας σε λαρυγγικές προσβολές χωρίς θεραπευτική παρέμβαση, ενώ 25% με 30% των ασθενών εκτιμάται ότι καταλήγει λόγω οιδήματος λάρυγγα πριν τη χορήγηση αποτελεσματικής θεραπείας.⁶⁹ Προσβολές που εμπλέκουν τα γεννητικά όργανα έχουν αναφερθεί στα δύο τρίτα των ασθενών κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Επιπλέον, κρίσεις που αφορούν την ουροδόχο και τους νεφρούς έχουν αναφερθεί, όμως είναι λιγότερο κοινές, εντοπιζόμενες στο 5% των ασθενών. Οι γεννητικές προσβολές πυροδοτούνται είτε μετά από τοπικό τραυματισμό είτε αυτόματα χωρίς εμφανές αίτιο.¹¹ Λιγότερο συχνές αλλά κλινικά σημαντικές εκδηλώσεις του ΚΑΟ μπορεί να περιλαμβάνουν νευρολογικά, πνευμονικά, νεφρικά, ουρολογικά ή μυοσκελετικά συμπτώματα

πολλά από τα οποία έχουν εντοπισθεί σχετικά πρόσφατα. Το οίδημα της μαλακής υπερώας, σταφυλής και σπάνιας της γλώσσας μπορεί να συμβεί μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με οίδημα του λάρυγγα. Ισχυρή κεφαλαλγία συνοδευόμενη από άλλα νευρολογικά συμπτώματα όπως διαταραχές όρασης, μειωμένη ισορροπία και αποπροσανατολισμός έχει περιγραφεί πρόσφατα σε ασθενείς με ΚΑΟ. Διαλείποντα πνευμονικά και οισοφαγικά συμπτώματα έχουν καταγραφεί σε ένα αριθμό ασθενών, περιλαμβάνοντας θωρακικό άλγος, αναπνευστική δυσχέρεια και άλγος κατά την κατάποση. Τα ουρολογικά συμπτώματα περιλαμβάνουν δυσχέρεια κατά την ούρηση, άλγος στην ούρηση και σπασμό της κύστεως. Άλγος και οίδημα των ωμικών, των ισχιακών αρθρώσεων και των μυών του αυχένα, της ράχης και των άκρων έχει αναφερθεί σε ορισμένους ασθενείς.¹¹



Εικόνα 6. Οίδημα σε ασθενείς με ΚΑΟ. Η εικόνα Α δείχνει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας με βάριο σε ασθενή κατά τη διάρκεια κοιλιακής προσβολής, υπάρχουν διακριτά στοιχεία υποβλεννογόνιου οιδήματος του τελικού τμήματος του λεπτού εντέρου με όξυνση και πάχυνση των εντερικών πτυχών. Η εικόνα Β απεικονίζει μια περίπτωση ασύμμετρου οιδήματος άκρων χειρών. Στην εικόνα C, μία ασθενής κατά την διάρκεια προσβολής του προσώπου. (Zuraw BL. *N Engl J Med* 2008;359:1027-36)

Σύμφωνα με αναδρομικές μελέτες μεγάλου αριθμού ασθενών, τα αρχικά συμπτώματα του ΚΑΟ εμφανίζονται μέσα στην 1^η δεκαετία της ζωής στο 50%, κατά τη διάρκεια της 2ης στο 35%, και μετά τα 20 έτη ζωής στο υπόλοιπο 15% των ασθενών.⁷⁰ Παρόλο που ο μέσος όρος έναρξης των συμπτωμάτων είναι η ηλικία μεταξύ 8 και 12 ετών, μπορεί να εκδηλωθούν ακόμα και στο πρώτο έτος της ζωής.⁷¹ Κατά τον Bork et al ο ετήσιος αριθμός κρίσεων είναι διπλάσιος στους ασθενείς με ηλικία έναρξης πριν από την ηλικία των 5 ετών συγκριτικά με τους ασθενείς με ηλικία έναρξης μετά τα 15 έτη.⁵⁴ Σε μια ανάλυση 313 ασθενών με C1-INH-ΚΑΟ, ο μέσος χρόνος ως τη διάγνωση μετά την αρχική εμφάνιση των συμπτωμάτων ήταν 8.3 έτη και οι ασθενείς ανέφεραν κατά μέσο όρο την επίσκεψη σε 4.4 ιατρούς πριν λάβουν την ακριβή διάγνωση. Οι αλλεργικές αντιδράσεις και η σκωληκοειδίτιδα ήταν οι συχνότερες λανθασμένες διαγνώσεις.⁷² Δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις όπου ασθενείς με αγγειοοίδημα εντέρου έχουν υποβληθεί σε άσκοπες επεμβάσεις λόγω λανθασμένης διάγνωσης οξείας κοιλίας.⁷³ Μια μελέτη

έδειξε ότι το μη ορθά διεγνωσμένο C1-INH-KAO με γαστρεντερικές κρίσεις οδηγεί σε μη αναγκαία σκωληκοειδεκτομή ή λαπαροτομία το 35% των ασθενών.⁷²

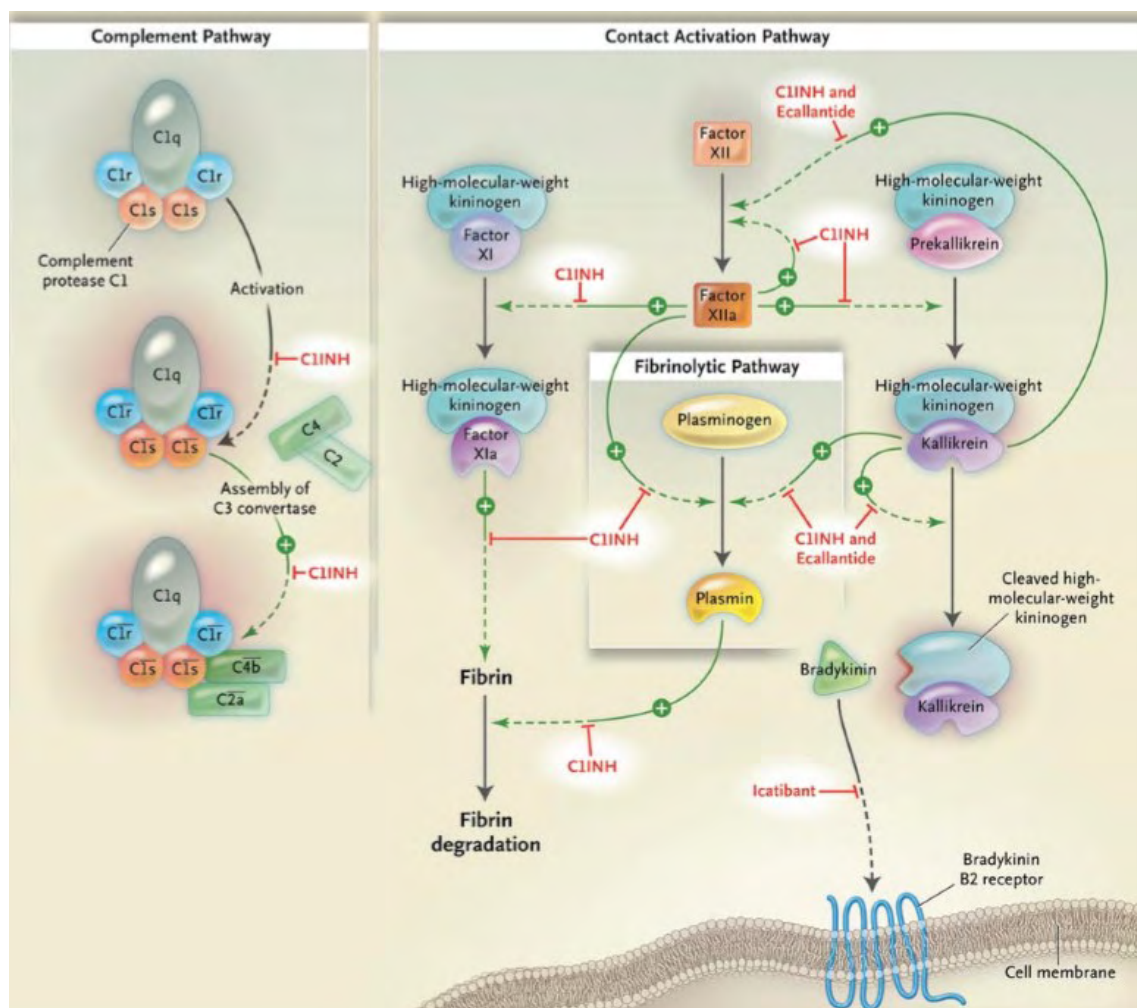
5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΠΑΦΗΣ ΣΤΟ ΚΑΟ

Το σύστημα επαφής αποτελείται από τον FXII, την PK, το HK και τον FXI.⁷⁴ Ο όρος σύστημα επαφής αναφέρεται στο γεγονός ότι το σύστημα ενεργοποιείται μετά από επαφή του αίματος με αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια.⁷⁵ Στους *in vitro* ενεργοποιητές περιλαμβάνονται η θεική δεξτράνη, τα φωσφολιπίδια,⁷⁶ ενώ στους *in vivo* ενεργοποιητές ανόργανα πολυφωσφορικά αιμοπεταλίων,⁷⁷ ηπαρίνη των μαστοκυττάρων,⁷⁸ θρόμβοι ινικής⁷⁹ πρωτεΐνες της υπενδοθηλιακής θεμέλιας ουσίας όπως κολλαγόνο και λαμινίνη⁸⁰ μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες,⁸¹ εξωκυττάριο RNA. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές στην ενεργοποίηση του συστήματος επαφής σε πλάσμα ασθενών με υπέρταση, ελκώδη κολίτιδα, συστηματικό ερυθρεματοειδές.⁸²

Υπάρχουν επαρκή στοιχεία που τεκμηριώνουν την συμμετοχή του συστήματος επαφής στις κρίσεις αγγειοιδήματος. Αρχικά, κατά τη διάρκεια των κρίσεων, τα κυκλοφορούντα επίπεδα του αποδομημένου HK, όπως και της BK, αυξάνονται, σε αντίθεση με τα επίπεδα των πρωτεϊνών FXII, PK, και HK, τα οποία μειώνονται.^{61,94,83} Επιπλέον οι ασθενείς με ΚΑΟ εμφανίζουν υψηλή ενζυμική δραστηριότητα εξαρτώμενη από την PK κατά τη διάρκεια των κρίσεων.⁸⁴ Δεύτερον, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *FXII* σχετίζονται με την εμφάνιση αγγειοιδήματος απουσία ανεπάρκειας C1INH, υποστηρίζοντας τον ρόλο του FXII στην πυροδότηση των κρίσεων αγγειοιδήματος.⁸⁵ Φάρμακα τα οποία αναστέλλουν την PK ή μπλοκάρουν την αλληλεπίδραση της BK με τον υποδοχέα B2R ελαττώνουν την αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα σε ποντίκια με έλλειψη C1INH και μειώνουν την ένταση και την διάρκεια των κρίσεων σε ασθενείς με ΚΑΟ.⁹³

Ένα κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του συστήματος επαφής είναι γνωστό ως FXII αυτοενεργοποίηση. Η ενεργοποίηση του συστήματος επαφής ξεκινά με τη ενεργοποίηση του FXII, ο οποίος στη συνέχεια μετατρέπει την προκαλρικρεΐνη σε καλρικρεΐνη. Ο μονής αλυσίδας FXII υφίσταται αυτοενεργοποίηση, μια σχετικά αργή διαδικασία δημιουργώντας το ενεργό ένζυμο. Αυτό οδηγεί σε έναν FXIIa διπλής αλυσίδας δισουλφιδικά συνδεδεμένων, με την 28.5 kD καρβοξυτελική ελαφρά αλυσίδα περιέχουσα το ενεργό κέντρο.⁸⁶ Εφόσον μια μικρή ποσότητα FXII ενεργοποιηθεί σε FXIIa, μετατρέπει την προκαλρικρεΐνη σε PK, η οποία με τη σειρά της μετατρέπει τον εναπομείνων FXII σε FXIIa. Η PK έχει δύο υποστρώματα, αντίστοιχως ενεργοποιεί επιπλέον FXII και διασπά το HK, μία α-σφαιρίνη μοριακού βάρους 120kD αποτελούμενη από τέσσερις υπομονάδες, η τελευταία των οποίων αποτελεί τη BK. Με αυτό τον τρόπο η αμφίδρομη ενεργοποίηση των FXII και PK δείχνει πως το σύστημα επαφής διαθέτει συμπεριφορά όλα ή τίποτα κατά την ενεργοποίηση.⁸⁷ Ο φυσιολογικά βραδύς ρυθμός της FXII αυτοενεργοποίησης επιταχύνεται σημαντικά υπό την παρουσία αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας.⁸⁸ Η επιφάνεια επάγει την αλλαγή στη διαμόρφωση του συνδεδεμένου FXII και διευκολύνει την ενεργοποίησή του από τον FXIIa (αυτοενεργοποίηση) ή την PK (trans-ενεργοποίηση).⁸⁹ Εναλλακτικά, η PK μπορεί να αυτοενεργοποιηθεί μετά την πρόσδεση στο HK. Η αυτοενεργοποίηση μπορεί να επιταχυνθεί μέσω της πρωτεΐνης θερμικού στρες 90 (HSP90), η οποία εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.⁹⁰ Άλλος πιθανός ενεργοποιητής της PK είναι η PRCP.⁹¹ Εφόσον η PK ενεργοποιηθεί, η αμοιβαία ενεργοποίηση του FXII πολλαπλασιάζει την ενεργοποίηση του συστήματος επαφής. Επιπλέον, ο ενεργοποιημένος FXIIa και η PK μπορούν

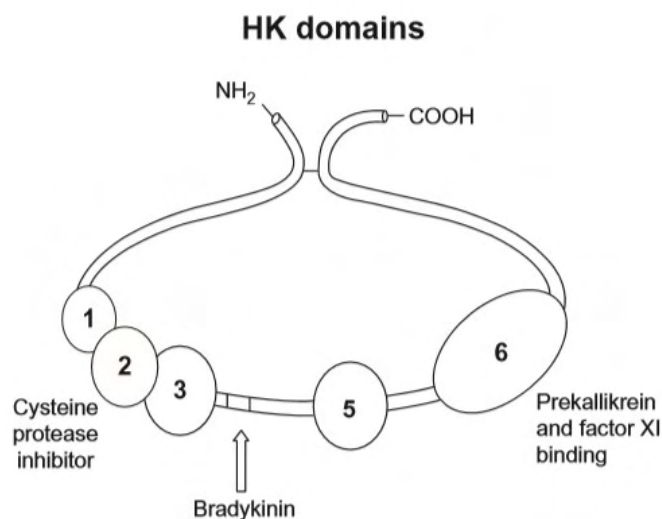
να ενεργοποιήσουν κάποιους ινωδολυτικούς παράγοντες και παράγοντες συμπληρώματος διαμεσολαβώντας έτσι στην διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ των συστημάτων επαφής, ινωδόλυσης και συμπληρώματος.⁹²



Εικόνα 7. Μονοπάτια που αναστέλλονται από τον C1INH και νέα φάρμακα. Στην κλασική οδό του συμπληρώματος C1, η πρωτεάση ενεργοποιείται και επιστρατεύει την C3 κονβερτάση. Στο μονοπάτι επαφής, μικρές ποσότητες FXIIa ενεργοποιούν επιπλέον FXII, όπως και προκαλλικρεΐνη. Ο FXIIa ενεργοποιεί τον FXI σε FXIa, οδηγώντας σε αυξημένο σχηματισμό ινώδους. Ο ενεργοποιημένος FXIIa και η PK αλληλοενεργοποιούνται οδηγώντας σε διάσπαση του HK και απελευθέρωση BK. Στο μονοπάτι της ινωδόλυσης το πλασμινογόνο ενεργοποιείται σε πλασμίνη η οποία διασπά το ινωδογόνο. (Kaplan AP, Joseph K. *Adv Immunol* 2014;121:41-89)

Κατά την ενεργοποίηση του συστήματος επαφής το μείζον βιολογικά δραστικό παραγόμενο πεπτίδιο είναι η BK, ένα εννιαπεπτίδιο δημιουργούμενο από το HK κατόπιν διάσπασης από την PK. Ανήκει στη ομάδα των προφλεγμονωδών πεπτιδίων της οικογένειας των κινινών και συγκαταλέγεται μεταξύ των πιο δραστικών αγγειοδιαστολέων. Δεδομένα από πολυάριθμες in vitro μελέτες, υποστηρίζουν ισχυρά το ρόλο της BK ως τον κύριο διαμεσολαβητή του ιστικού αγγειοοιδήματος στο ΚΑΟ.⁹³ Η πρώτη απόδειξη των αυξημένων επιπέδων BK κατά τη διάρκεια των κρίσεων αγγειοοιδήματος σε ανεπάρκεια C1-INH έγινε από τους Nussberger et al.⁶¹ Επιπλέον, η BK βρέθηκε αυξημένη στις περιοχές εμφάνισης του οιδήματος.⁹⁴ Επειδή ο C1-INH αποτελεί το κύριο αναστολέα της PK δράσης, η μη αντιστρεπτή κατανάλωση του C1-INH έχει ως αποτέλεσμα την υπέρμετρη παραγωγή BK, η οποία προκαλεί αγγειοδιαστολή, αγγεική διαφυγή και επακόλουθο αγγειοοίδημα και άλγος. Αφού σχηματιστεί,

μετατρέπεται γρήγορα σε des- Arg9- BK από την καρβοξυπεπτιδάση N, η οποία απομακρύνει την καρβοξυτελική αργινίνη.⁹⁵



Εικόνα 8. Η δομή του HK. Η περιοχή βαριάς αλυσίδας αποτελείται από τρεις ομόλογες υπομονάδες (1-3) από τις οποίες οι δύο τελευταίες αποτελούν θέσεις αναστολής σουλφιδρυλοπρωτεασών. Η περιοχή 4 αποτελεί τη BK. Η περιοχή ελαφράς αλυσίδας περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης σε επιφάνεια (περιοχή 5) και τις αλληλεπικαλυπτόμενες θέσεις πρόσδεσης για τους FXI και PK (περιοχή 6). (Kaplan AP, Joseph K. *Adv Immunol* 2014;121:41-89)

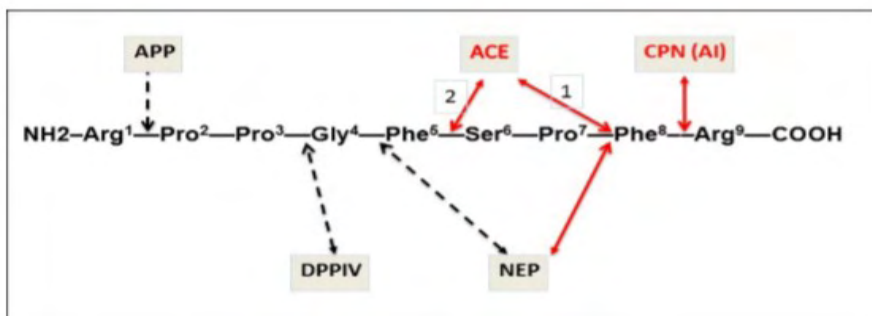
Οι βιολογικές δράσεις της BK ασκούνται μέσω της ενεργοποίησης του B2R, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με G-πρωτεΐνες και γενικά εκφράζεται ιδιосуστασιακά στο αγγειακό ενδοθήλιο και τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών. Κατά την πρόσδεση, ο υποδοχέας ενεργοποιείται και μεταδίδει ένα σηματοδοτικό καταρράκτη οδηγώντας σε αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, απελευθέρωση νιτρικού οξειδίου και προσταγλανδίνης E, τα οποία ενισχύουν την αγγειοδιαστολή και την προκαλούμενη εξαγγείωση υγρού στα υποδόριους ιστικούς χώρους.⁹³ Μετά την ενεργοποίηση ο υποδοχέας απευαισθητοποιείται, ενδοκυτταρώνεται και επανευαισθητοποιείται. Στον άνθρωπο, υπάρχει επιπλέον ο υποδοχέας B1R ο οποίος ενεργοποιείται επίσης από την desArg(10)-καλλιιδίνη ή desArg(9)-BK. Ο B1R επάγεται κατόπιν ιστικού τραυματισμού, δράσεως κυτταροκινών ή ενοφθαλμισμού με βακτηριακές ενδοτοξίνες, όπως η λιποπολυσακχαρίδη.⁹⁶ Σε ποντίκια με ανεπάρκεια C1-INH η έγχυση ενός B1R ανταγωνιστή δεν έδειξε μείωση της αγγειακής διαπερατότητας.⁹³ Από την άλλη, ο αποκλεισμός και των δύο υποδοχέων B1R και B2R προλαμβάνει την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας η οποία επάγεται στο πλάσμα ασθενών με ΚΑΟ σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα.⁹⁷ Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι ασθενείς με ΚΑΟ και υψηλούς τίτλους πυρηνικού αντιγόνου Epstein-Barr εμφανίζουν συχνότερα προσβολές του ανώτερου αναπνευστικού σε σχέση με ασθενείς με χαμηλότερους τίτλους.⁹⁸ Εικάζεται ότι η τοπική επανενεργοποίηση του ιού οδηγεί σε παραγωγή κυτταροκινών, οι οποίες επάγουν τοπικά τον B1R. Ενώ ο B2R απευαισθητοποιείται ταχέως μετά την αλληλεπίδραση του με τη BK, ο B1R αντίθετα χρειάζεται αρκετές ώρες για να ευαισθητοποιηθεί, αλλά από τη στιγμή που συμβεί αυτό, παραμένει για περισσότερο χρόνο στην κυτταρική μεμβράνη.⁹⁹ Επομένως, μπορεί να υποθέσει κανείς πως η αγγειακή διαπερατότητα αρχικά διαμεσολαβείται από τον B2R και διατηρείται στη συνέχεια μέσω του B1R. Πράγματι, οι κρίσεις ΚΑΟ εμφανίζουν μια αργή εξέλιξη εντός αρκετών ωρών και τα συμπτώματα μπορούν να διαρκέσουν για ημέρες χωρίς θεραπεία.¹⁰⁰

Τα επίπεδα BK στο φλεβικό σύστημα των προσβεβλημένων άκρων είναι υψηλότερα σε σχέση με των άκρων τα οποία δεν έχουν προσβληθεί, όπως έχει δειχθεί σε ασθενείς με ΚΑΟ και περιφερική προσβολή, υποστηρίζοντας την συμμετοχή μιας τοπικής διαδικασίας ενεργοποίησης στην εμφάνιση του αγγεοοιδήματος.⁹⁴ Οι αντιδράσεις του συστήματος επαφής λαμβάνουν χώρα τοπικά στην επιφάνεια του αγγειακού ενδοθηλίου.¹⁰¹ Η μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων φαίνεται να αποτελεί μια φυσική τοποθεσία για την παραγωγή BK επειδή ο FXII προσδένεται στο σύμπλοκο u-PAR και CK1 το οποίο εκφράζεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.¹⁰² Η εξωηπατική σύνθεση του C1-INH μπορεί επίσης να εξηγήσει την εμφάνιση συμπτωμάτων τα οποία παραμένουν τοπικά. Παρά την κοινή αποδοχή ότι ο κυκλοφορούν C1-INH παράγεται κυρίως από το ήπαρ, η σύνθεσή του έχει αποδειχθεί και σε άλλα ανθρώπινα κύτταρα όπως μονοκύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα της ομφαλικής φλέβας και μεγακαρυοκύτταρα.¹⁰³ Η εξωηπατική σύνθεση του C1-INH πιθανώς συμβάλλει στη συγκέντρωση του πλάσματος, η οποία παραμένει σχεδόν φυσιολογική σε ασθενείς με σοβαρά ηπατικά νοσήματα,¹⁰⁴ αλλά πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι ρυθμίζει τη φλεγμονώδη δράση τοπικά παραγόμενων πρωτεολυτικών ενζύμων. Αλλαγές στην τοπική πρωτεϊνική έκφραση είναι πιθανό να τροποποιούν τις ισορροπίες μεταξύ αναστολέα και πρωτεασών στόχων οδηγώντας σε τοπική αγγειακή διαρροή. Η εκλεκτική ιστική έκφραση αυτών των στοιχείων διευκολύνει την παραγωγή BK η οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τον B2R, ο οποίος είναι επίσης τοποθετημένος στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.⁷⁴

Εν τούτοις, αρκετές παρατηρήσεις προτείνουν την συστηματική ενεργοποίηση του συστήματος επαφής κατά τη διάρκεια κρίσεων ΚΑΟ. Η ενδοφλέβια έγχυση BK σε φυσιολογικούς εθελοντές σε τόσο υψηλά επίπεδα ώστε να προκληθεί ήπια πτώση της αρτηριακής πίεσης δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της στο φλεβικό αίμα λόγω του ταχέως μεταβολισμού της στο πιο σταθερό προϊόν BK₁₋₅ (Arg-Pro-Gly-Phe) από πεπτιδάσες.¹⁰⁵ Ωστόσο, ζωικές μελέτες έχουν δείξει ότι πάνω από το 99% της εγχυόμενης BK στο φλεβικό σύστημα καθαίρεται κατά τη διάρκεια μιας και μοναδικής διέλευσης από τους πνεύμονες.¹⁰⁶ Για αυτό το λόγο τα ανιχνεύσιμα επίπεδα BK στο φλεβικό σύστημα του μη προσβεβλημένου μέλους σε ασθενείς με ΚΑΟ θα μπορούσε να εξηγηθεί από μια συστηματική ενεργοποίηση του συστήματος επαφής, πυροδοτούμενη από μια αρχική τοπική διαδικασία ενεργοποίησης και κορεσμού των μηχανισμών κάθαρσης των πνευμόνων. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να δικαιολογήσει την εμφάνιση οιδήματος σε πάνω από μια περιοχές ταυτοχρόνως. Πάνω από το 1/3 των συμπτωματικών ασθενών που προσέρχονται στο νοσοκομείο σε αναζήτηση θεραπείας αναφέρουν προσβολή πολλαπλών περιοχών.¹⁰⁷ Ακόμα μία κλινική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι συχνά οι ασθενείς με ΚΑΟ (85-90%) εκδηλώνουν πρόδρομα συμπτώματα¹⁰⁸ τα οποία είναι δύσκολο να ερμηνευθούν μόνο μέσω τοπικής ενεργοποίησης του συστήματος επαφής.

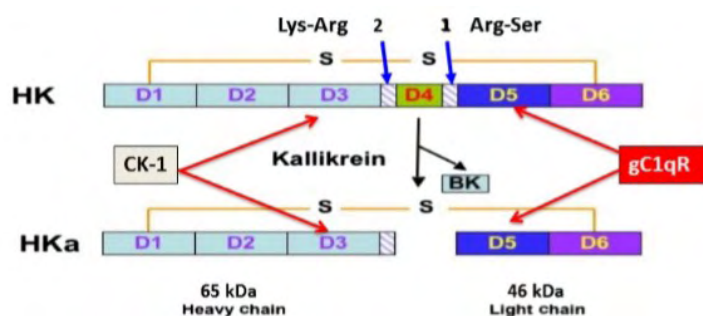
Στους ανθρώπους ο χρόνος ημιζωής της BK είναι περίπου 30 δευτερόλεπτα¹⁰⁹ καθώς στα βιολογικά υγρά μεταβολίζεται γρήγορα από πεπτιδάσες. Η αλληλουχία της φέρει αργινίνη στα άκρα.⁹² Ο αμινοτελικός δεσμός Arg₁-Pro₂ διασπάται από την αμινοπεπτιδάση P (APP).¹¹⁰ Παρόλο που δεν προκαλεί τροποποίηση στο μεταβολισμό της BK, η μειωμένη δραστηριότητα της APP του πλάσματος έχει συσχετιστεί με σημαντικά μειωμένο καταβολισμό της des-Arg⁹-BK in vitro σε δείγματα ασθενών με ιστορικό ACEi-ΚΑΟ.¹¹¹ Στο καρβοξυτελικό άκρο, η BK επεξεργάζεται από ένζυμα τα οποία διασπούν είτε το δεσμό Pro₇-Phe₈ είτε το δεσμό Phe₈-Arg₉. Αυτά τα ένζυμα διαχωρίζονται σε δύο ομάδες: κινινάσες I και II. Οι κινινάσες II στις οποίες ανήκουν το MEA και η νεπρυλσίνη, αποκόπτουν το δεσμό Pro₇-Phe₈. Το MEA, το οποίο είναι

ιδιαίτερα άφθονο στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων των πνευμονικών αγγείων, απομακρύνει το διπεπτίδιο Phe-Arg από το καρβοξυτελικό άκρο της BK για να αποδώσει ένα επταπεπτίδιο αρχικά και με μια ακόλουθη δεύτερη διάσπαση αποδίδει ένα μη λειτουργικό πενταπεπτίδιο.¹¹² Οι κινινάσες I στις οποίες ανήκουν μεταξύ των άλλων η καρβοξυπεπτιδάση N (CPN) και η καρβοξυπεπτιδάση M (CPM) διασπούν τον Phe₈-Arg₉ δεσμό. Η απομάκρυνση της καρβοξυτελικής αργινίνης από τις κινινάσες I δημιουργεί την desArg₉-BK, μέσω ενός μεταβολικού μονοπατιού η σημασία του οποίου επιδεικνύεται από την παρατήρηση περιπτώσεων αγγειοσιδήματος σε ασθενείς με έλλειψη CPN ή αναστολής του MEA.¹⁰⁹ Αυτό το προϊόν αποδόμησης είναι πιο σταθερό και διαθέτει υψηλή συγγένεια για τον B1R.

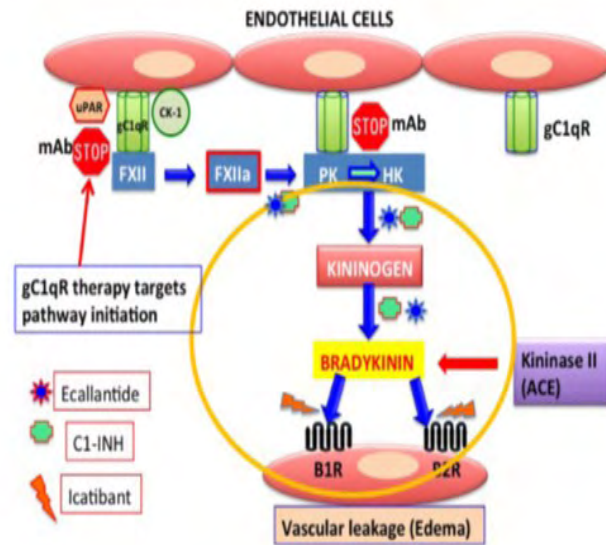


Εικόνα 9. Αποδόμηση της BK σε ανενεργά πεπτίδια από ρυθμιστικά ένζυμα. ACE:μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης, APP:αμινοπεπτιδάση P, NEP: ουδέτερη ενδοπεπτιδάση, DPP4:διπεπτιδυλαμινοπεπτιδάση IV, CPN: καρβοξυπεπτιδάση N.(Ghebrehiwet et al.*Immunological Reviews* 2016;274:281–289)

Εκτός από τη BK, ακόμα μία κίνηνη μπορεί να δημιουργηθεί τόσο από το HK όσο και από το χαμηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (LK), γνωστή ως λυσιλ-βραδυκίνη (Lys-BK) ή καλλιδίνη. Οι BK, Lys-BK, και οι μεταβολίτες τους, desArg₉-BK και Lys-desArg₉-BK αλληλεπιδρούν με τους B1R και B2R στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων ρυθμίζοντας την αγγειακή διαπερατότητα.¹¹³ Παρόλο που οι αποκαρβοξυλιωμένοι μεταβολίτες της BK διαθέτουν πτωχή συγγένεια για τους B2R, είναι ισχυροί αγωνιστές των αυστηρά ρυθμιζόμενων B1R, η έκφραση των οποίων αυξάνεται σε φλεγμονώδεις διεργασίες. Η συσσώρευση des-Arg₉-BK φάνηκε να έχει προφλεγμονώδεις δράσεις in vivo, τουλάχιστον όταν εκφράζονται οι B1R.¹¹⁴ Συνεπώς, αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να είναι κρίσιμη για την ενίσχυση και τη διατήρηση της αγγειακής διαπερατότητας που προκαλείται από την αρχική BK-B2R αλληλεπίδραση.¹¹³



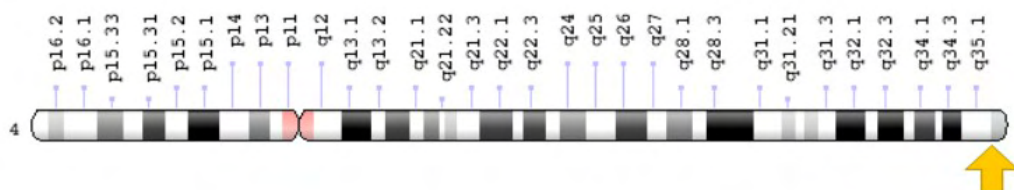
Εικόνα 10. Παραγωγή BK από το HK. Το HK είναι ένα μόριο μονής αλυσίδας συνδεδεμένο με διασουλφιδικούς δεσμούς, αποτελούμενο από έξι περιοχές. Η διάσπαση του δεσμού Arg-Ser (1) από την PK ακολουθούμενη από διάσπαση του δεσμού Lys-Arg (2) στην περιοχή 5 απελευθερώνει τη BK αφήνοντας το HKα, ένα μόριο διπλής αλυσίδας 65kDa και 46kDa συνδεδεμένο με δισουλφιδικό δεσμό. Επιλέον, απεικονίζονται οι θέσεις πρόσδεσης των gC1qR και CK-1 στο HK.(Ghebrehiwet et al.*Immunological Reviews* 2016;274:281–289)



Εικόνα 11. Ενεργοποίηση του συστήματος κινινών. Το σύστημα κινινών ενεργοποιείται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων όταν ο FXII προσδένεται στο τριμοριακό σύμπλοκο αποτελούμενο από τα μόρια gC1qR, uPAR, CK-1 και υφίσταται αυτοκαταλυτική μετατροπή για να δημιουργήσει τον FXIIa. Ο FXIIa μετατρέπει την προκαλικρεΐνη σε PK, το ένζυμο το οποίο πέπτει το HK για να δημιουργηθεί η BK. Η BK επάγει την αγγειακή διαπερατότητα με τη βοήθεια δύο υποδοχέων, του BR1 ο οποίος είναι επαγόμενος και τον BR2, ο οποίος εκφράζεται ιδιосуστασιακά στα περισσότερα κύτταρα. Εν απουσία C1-INH, ο απορρυθμισμένος σχηματισμός BK αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα οδηγώντας σε αγγειοοίδημα. Τα διαθέσιμα θεραπευτικά μέσα στοχεύουν ειδικά σημεία στην διαδικασία ενεργοποίησης, και περιλαμβάνουν μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία εμποδίζουν την πρόσδεση του HK στον gC1qR. (Ghebrehiwet. *F1000Research* 2016 5F1000 Faculty Rev:2840)

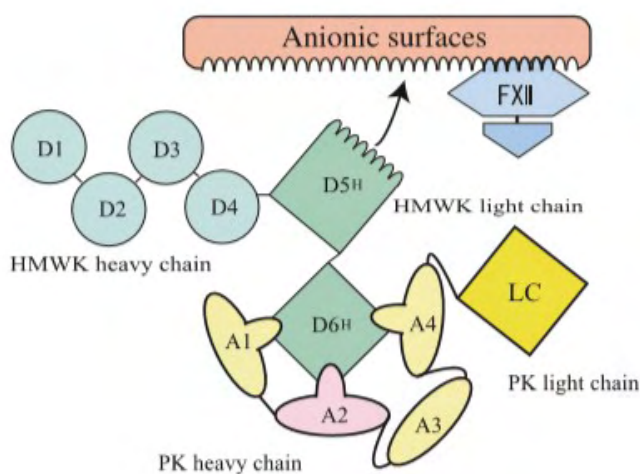
6. Η ΚΑΛΙΚΡΕΪΝΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Η PK ή καλικρεΐνη B1 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη και ανήκει στην ομάδα των καλικρεϊνών, οι οποίες αποτελούν πρωτεάσες σερίνης. Καταλύουν το σχηματισμό των κινινών και άλλων αγγειοδραστικών πεπτιδίων τα οποία με τη σειρά τους εμπλέκονται στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της νεφρικής λειτουργίας¹¹⁵, στην τοπική φλεγμονώδη απόκριση, στη πήξη του αίματος, στην ινωδόλυση. Συντίθεται στο ήπαρ και εκκρίνεται στο αίμα ως προκαλικρεΐνη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ενεργό PK, μέσω διάσπαση στις περιοχές Arg-371 και Ile-372 από τον FXIIa.^{116,117} Το γονίδιο της ανθρώπινης PK (*KLKB1*) εδράζεται στην περιοχή q34–35 του χρωμοσώματος 4, εκτείνεται κατά προσέγγιση σε μήκος 31 kb και περιλαμβάνει 15 εξόνια και 14 ιντρόνια.¹¹⁸ Το μεγαλύτερο ιντρόνιο, F, καταλαμβάνει περίπου 12 kb. Η ανακάλυψη της αλληλουχίας του γονιδίου έγινε βάση μελετών οι οποίες είχαν προηγηθεί για τον FXI, μία άλλη πρωτεάση σερίνης που παρουσιάζει 58% ομοιότητα στην αλληλουχία με την PK και συμμετέχει στην πήξη του αίματος.¹¹⁹



Εικόνα 12. Γονιδιακή Χαρτογράφηση του *KLKB1* (<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KLKB1#location>)

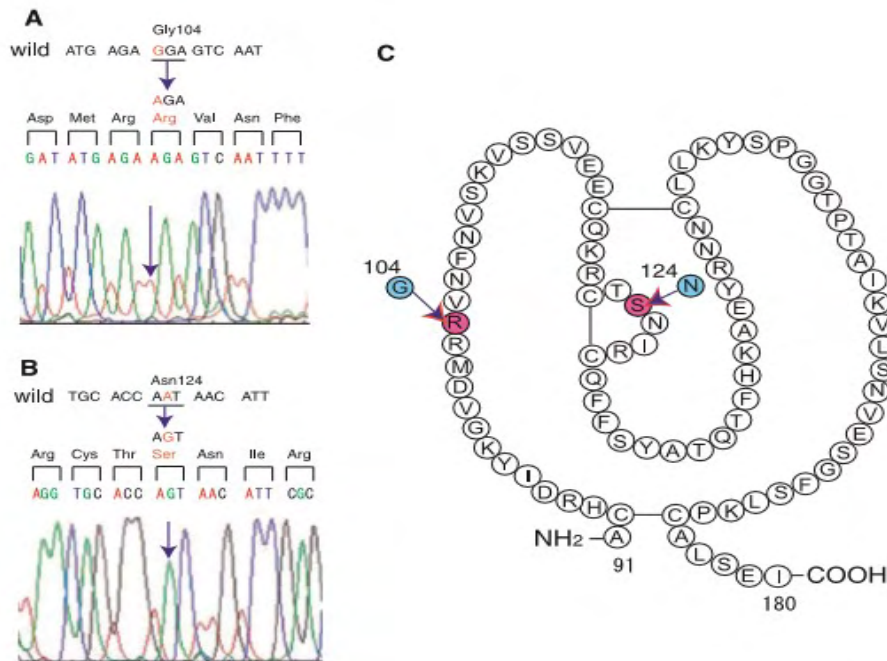
Η πλήρης αλληλουχία του *KLKB1* κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο σήματος 19 αμινοξέων και την πλήρη αλληλουχία ενός ώριμου μορίου προκαλλικρεΐνης αποτελούμενης από 619 αμινοξέα. Η μονή αλυσίδα του ώριμου μορίου της προκαλλικρεΐνης του πλάσματος διασπάται κατά την αντίδραση ενεργοποίησης σε μία βαριά αλυσίδα (371 αμινοξέα) και μία ελαφρά αλυσίδα (248 αμινοξέα). Η βαριά αλυσίδα διαθέτει συγγένεια ως προς το HK και η ελαφρά αλυσίδα περιέχει το ενεργό κέντρο της πρωτεάσης σερίνης. Το τελικό μόριο της PK αποτελείται από αυτές τις δύο αλυσίδες συνδεδεμένες με δισουλφιδικό δεσμό. Η καταλυτική περιοχή εντοπίζεται στην ελαφρά αλυσίδα και περιλαμβάνει την καταλυτική τριάδα του ενεργού κέντρου: His-415, Asp-464 και Ser-559. Η βαριά αλυσίδα αποτελείται από τέσσερις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που ονομάζονται περιοχές apple A1, A2, A3 και A4, κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από 90 ή 91 αμινοξέα και διαμεσολαβούν στην πρόσδεση του κυριότερου υποστρώματός της, του HK. Ενώ το 25% της PK κυκλοφορεί ελεύθερο στο πλάσμα, ένα 80% κυκλοφορεί ως σύμπλοκο με το HK. Η πρόσδεση λαμβάνει χώρα μεταξύ της βαριάς αλυσίδας της PK και της καρβοξυτελικής περιοχής (Ser565–Lys595) της περιοχής 6 (D6H) της ελαφράς αλυσίδας του κινινογόνου. Η διατήρηση των δισουλφιδικών δεσμών στις περιοχές apple της καλλικρεΐνης υποδηλώνει ότι η τεταρτοταγής δομή είναι πολύ σημαντική για τη βιολογική της λειτουργία, όπως η πρόσδεση της στο κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους. Λόγω της πρόσδεσης στο HK, η PK γίνεται ανθεκτική στην απενεργοποίηση από την α2-μακροσφαιρίνη ή τον C1-INH. Επιπλέον, αυτή η σύνδεση διευκολύνει τη δημιουργία συμπλόκου με τον FXII πάνω σε αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια του ενδοθηλίου.¹²⁰



Εικόνα 13. Η περιοχή Apple παρέχει μια μείζονα θέση πρόσδεσης για το HK. Η εικόνα παρουσιάζει τη θέση πρόσδεσης της PK στο HK όπου προσδένεται στην περιοχή D6H της ελαφράς αλυσίδας του. Η περιοχή Apple θεωρείται η μείζονα θέση αγκυροβόλησης για το HK και περιτοιχίζεται από τις περιοχές A1, A4 οι οποίες επίσης συνεισφέρουν στην ασυνεχή θέση πρόσδεσης. Η περιοχή LC αναπαριστά την ελαφρά αλυσίδα της PK. Η D5 αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης σε τεχνητές επιφάνειες η οποία συνδέεται με ανιονικές επιφάνειες, η D4 αποτελεί τμήμα της βαριάς αλυσίδας του HK, η οποία περιλαμβάνει τη BK. (Renne T et al. *J Biol Chem* 1999;274:25777–84)

7. Ο ΡΟΛΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ KLKB1-428G/A ΣΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΚΡΕΪΝΗΣ

Η πιο γνωστή διαταραχή της καλλικρεΐνης γνωστής και ως παράγοντα «Fletcher» αφορά την ανεπάρκειά της (PKD) η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Hathaway et al. και χαρακτηρίστηκε ως αυτοσωμική υπολλειπόμενη κληρονομούμενη ασθένεια.¹²¹ Σχεδόν 30 περιπτώσεις έχουν αναφερθεί έως τώρα.¹²² Η PKD είναι μια σπάνια πάθηση η οποία ανιχνεύεται μέσω διαταραχών της πηκτικότητας και χαμηλής PK δραστικότητας στο πλάσμα. Παρόλο που πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η διαταραχή πηκτικότητας στην PKD δεν εκδηλώνεται κλινικώς, υπάρχουν μερικές αναφορές για αιμορραγία στις αρθρώσεις¹²³ ή σχηματισμό θρόμβων.¹²⁴ Η PKD μπορεί να προκληθεί εξαιτίας ελαττωμένης έκφρασης του *KLKB1* ή στερεοτακτικών αλλαγών στην ελαφρά αλυσίδα της PK λόγω αμινοξικών αντικαταστάσεων.¹²⁵ Μία νέα οικογένεια που φέρει δύο αμινοξικές αντικαταστάσεις (Gly104Arg, Ser143Asn) στη βαριά αλυσίδα της PK, στην υπομονάδα A2, έχει ονομαστεί ως PKD Seki. Όσον αφορά την πρόσδεση της PK στο HK, κάποιες μελέτες έχουν υποστηρίξει ότι μόνο οι υπομονάδες A1 και A4 μεταξύ των τεσσάρων υπομονάδων της βαριάς αλυσίδας της PK εμπλέκονται την πρόσδεση,¹²⁶ αλλά σύμφωνα με τον Renne et al¹²⁷ οι υπομονάδες A1, A2 και A4, είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση του HK, ιδιαίτερα η A2 υπομονάδα προσδένεται ισχυρά στο τμήμα D6H της ελαφράς αλυσίδας του HK. Η επίδραση των μεταλλάξεων στη πρόσδεση της PK στο HK διερευνήθηκε μέσω της δημιουργίας μεταλλαγμάτων της A2 υπομονάδας σε βακτήρια *E. coli* από τον Katsuda et al. Η ικανότητα σύνδεσης της A2 υπομονάδας με τη μετάλλαξη Gly104Arg ή Ser143Asn χαρακτηρίστηκε ενδιάμεση εκείνης της A2 αγρίου τύπου και ισχυρότερη εκείνης της A2 υπομονάδας με τις ταυτόχρονες αντικαταστάσεις Gly104Arg, Ser143Asn. Αυτό το εύρημα επιβεβαίωσε την μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της A2 υπομονάδας που φέρει τις μεταλλάξεις Gly104Arg, Ser143Asn στο HK. Η βαριά μορφή της PKD προκύπτει με την ομόζυγη συγκληρονόμηση των Gly104Arg και Ser143Asn αντικαταστάσεων. Τα ευρήματα συνηγορούν ότι ο πολυμορφισμός Ser143Asn επηρεάζει τη λειτουργικότητα της PK στους PKD Seki ασθενείς όταν συγκληρονομείται με τη μετάλλαξη Gly104Arg.¹²⁸ Η ύπαρξη του πολυμορφισμού Ser143Asn μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην PK λειτουργία σε διαφορετικά άτομα, όμως στοιχεία για την αποκλειστική συσχέτισή του με κάποιο κλινικό φαινότυπο απουσιάζουν.¹²⁵



Εικόνα 14. Οι αντικαταστάσεις βάσεων που εντοπίζονται στο εξόνιο 5 της PK και η δομή της περιοχής Apple 2. Κάθε εξόνιο ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας γενωμικό DNA ως εκμαγείο. Κάθε εξόνιο της PK κλωνοποιήθηκε σε έναν T-φορέα. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία κάθε κλώνου προσδιορίστηκε με τη μέθοδο διδεοξυνουκλετιδίου (A). Παρουσίαση της δομής της περιοχής Apple 2 από την αλανίνη 91 έως την ισολευκίνη 180. Τρεις διαμοριακοί δεσμοί κυστεΐνης παρουσιάζονται με ευθείες γραμμές. Τα βέλη αναπαριστούν τις νουκλεοτιδικές (A,B) και αμινοξικές αντικαταστάσεις (C). Η αλληλουχία αναφοράς MN_000892 χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της CDNA αλληλουχίας της PK. (Katsuda et al. *Eur J Haematol* 2007 79:59–68)

8. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΥΠΟΣΤΗΡΙΖΟΥΝ ΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ KLKB1-428G/A

Η ύπαρξη του πολυμορφισμού Ser143Asn έχει μελετηθεί σε δύο πληθυσμούς εκ των οποίων, 34 Αφρικανοί και 46 Ευρωπαίοι, και η συχνότητα κάθε γονοτύπου περιγράφεται ως εξής: A/A:A/G:G/G = 0.412:0.471:0.118 για τον αφρικανικό πληθυσμό και 0.333:0.429:0.238 για τον ευρωπαϊκό.¹²⁵ Ο πολυμορφισμός S143N βρίσκεται στην περιοχή Apple 2 όπου προσδένεται το HK. Εφόσον η πλειονότητα της PK κυκλοφορεί σε σύμπλοκο με το HK και αυτό αποτελεί υποδοχέα για την PK στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, ο πολυμορφισμός Ser143Asn μπορεί να είναι λειτουργικά σημαντικός in vivo.¹²⁹ Ο πολυμορφισμός τροποποιεί μια θέση γλυκοζυλίωσης μειώνοντας την ικανότητα της PK να προσδένεται στο HK.¹²⁸ Μερικά SNPs φαίνεται να επηρεάζουν το βιολογικό φαινότυπο ατόμων και ορίζονται ως λειτουργικά.¹³⁰ Η δεσμευτική ικανότητα της ανασυνδυασμένης περιοχής A2 στο HK φαίνεται να επηρεάζεται από τη μετάλλαξη Gly104Arg και την ύπαρξη του πολυμορφισμού Ser143Asn, πράγμα το οποίο έχει οδηγήσει στο χαρακτηρισμό του πολυμορφισμού Ser143Asn ως λειτουργικού SNP.

Μελέτες με τη χρήση in vitro πρωτεόλυσης και κυτταρικής βιολογίας έχουν αποδείξει ότι ένα από τα υποστρώματα της PK αποτελεί και η προ-ρενίνη, η οποία μετατρέπεται στους νεφρούς σε ενεργό ρενίνη. Η συγκέντρωση της ρενίνης στο πλάσμα συνεισφέρει σημαντικά σε νόσους όπως η υπέρταση, η στεφανιαία νόσος, η χρόνια νεφρική νόσος.¹³¹ Πειράματα ανοσοφθορισμού σε παρασπειραματικά κύτταρα και νεφρικές τομές ποντικών έδειξαν υποκυτταρική συνεντόπιση των δύο πρωτεϊνών, το οποίο προτείνει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης

μεταξύ αυτών.¹³² Οι θέσεις διάσπασης που εμπλέκονται στην επεξεργασία της προρενίνης περιλαμβάνουν Lys-Arg, κατάλοιπα τα οποία αποτελούν σήματα αναγνώρισης για την PK.¹³³ Τα νορμοτασικά WKY ποντίκια διαθέτουν σημαντικά αυξημένη έκφραση *KLKB1* (~5.5 φορές) συγκριτικά με υπερτασικά SHR ποντίκια, με παρόμοια επίπεδα έκφρασης mRNA ρενίνης και στα δύο ζωικά μοντέλα. Έτσι η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης κάτω από διαφορετικές συνθήκες μπορεί να εμπλέκει τροποποίηση στην έκφραση είτε του γονιδίου *REN*, είτε του *KLKB1*. Με βάση αυτή την υπόθεση, δεδομένου του γεγονότος ότι η μετάλλαξη Ser143Asn ελαττώνει την πρόσδεσή της PK στο υπόστρωμα HK, οι Biswas et al. επέλεξαν τον πολυμορφισμό αυτό για να μελετηθεί η συσχέτισή του με την επεξεργασία της προρενίνης. Διαπιστώθηκε ότι οι φορείς του υπολλειπόμενου αλληλομόρφου G (Ser/Ser) εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα ενεργού ρενίνης πλάσματος.¹²⁸ Έτσι η PK πιθανόν να αποτελεί νέο θεραπευτικό στόχο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και η αναστολή της να συμβάλλει στην θεραπεία της υπέρτασης.

Ο πολυμορφισμός Ser143Asn έδειξε επίσης, σημαντική συσχέτιση με τα επίπεδα CT-προενδοθελίνης-1 (pre-pro-ET 168-203) και MR-προαδρενομεδουλίνης (pre-pro-ADM 45-91) στη μελέτη για την πρόληψη της νεφρικής και αγγειακής νόσου τελικού σταδίου PREVENT.¹³⁴ Η ET-1 είναι ένα πεπτίδιο 21 αμινοξέων εκκρινόμενο από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και θεωρείται μια από τις ισχυρότερες αγγειοσυσπαστικές ουσίες,¹³⁵ σε αντίθεση με την ADM, μια πεπτιδική ορμόνη 52 αμινοξέων η οποία εκκρίνεται από ποικιλία κυττάρων και είναι ισχυρός αγγειοδιαστολέας.¹³⁶ Και οι δύο ουσίες έχουν άμεση επίδραση στον αγγειακό τόνο και φέρεται να αλληλεπιδρούν επίσης με το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης όπως και η PK.¹³⁷ Η PK φέρει ακολουθίες οι οποίες αναγνωρίζουν τις θέσεις διάσπασης των προδρόμων των MR-προ-ADM και CT-προ-ET-1.^{133,138} Οι θέσεις διάσπασης που εμπλέκονται στην επεξεργασία τους περιλαμβάνουν αλληλουχίες Arg-Arg και Lys-Arg, κατάλοιπα τα οποία βρίσκονται μέσα στις ειδικές θέσεις αναγνώρισης της PK.¹³⁸ Με βάση την υπόθεση ότι η PK εμπλέκεται στην επεξεργασία των προ-προ-ET1 και προ-προ-ADM, οι Verweij et al κλωνοποίησαν cDNA των *ADM* και *ET-1* με σκοπό τη δημιουργία των αντίστοιχων σημασμένων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες επώασθηκαν με ενεργό κεκαθαρμένη ανθρώπινη PK και παρατηρήθηκε χρονοεξαρτώμενη διάσπαση τους σε μικρότερα πεπτίδια. Η αντίδραση μπορούσε να ανασταλλεί πλήρως από ένα αναστολέα PK. Τα ακριβή προϊόντα διάσπασης είναι ακόμα υπό διερεύνηση, και μελλοντικές μελέτες επιβάλλονται για την διαλεύκανση των πιθανών φυσιολογικών μηχανισμών μεταξύ της PK και αυτών των πεπτιδίων.¹³⁴

Σε μεγάλο πληθυσμό διαβητικών ασθενών έχει αποδειχθεί ότι η αυξημένη PK συσχετίζεται με επιτάχυνση της αγγειακής νόσου και πρωτεϊνουρία.¹³⁹ Το υπολλειπόμενο G αλληλόμορφο του πολυμορφισμού *KLKB1*-S143N σχετίζεται με μειωμένη καρδιαγγειακή νόσο.¹⁴⁰ Η φορεία του σπανιότερου αλληλομόρφου G (48.1%) συγκριτικά με τη μη φορεία συσχετίστηκε με μείωση της πιθανότητας ιστορικού στεφανιαίας νόσου κατά 24% και μείωση των βασικών τιμών άλλων μεταβλητών όπως αρτηριακή πίεση, ιστορικό στηθάγχης κατά 24%.¹⁴⁰ Επίσης η ύπαρξη του πολυμορφισμού συσχετίζεται θετικά με το νατριουρητικό πεπτίδιο τύπου B, έναν αναγνωρισμένο καρδιοπροστατευτικό αγγειοδιαστολέα σε αφροαμερικάνους.¹⁴¹ Τα δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο της PK στην αγγειακή ομοιόσταση και πως μπορεί η μειωμένη έκφρασή της να συμβάλλει στην βελτίωση της υγείας των αγγείων, μέσω μείωσης του κινδύνου αγγειακής θρόμβωσης. Μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη *KLKB1* δείχνουν ότι

εμφανίζουν καθυστερημένη αρτηριακή θρόμβωση χάρη στη μείωση του αγγειακού ιστικού παράγοντα και όχι στη μειωμένη ενεργοποίηση του συστήματος επαφής.^{142,143}

9. Η ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ ΤΟΥ ΚΑΟ

Ένα από τα χαρακτηριστικά του ΚΑΟ που προβληματίζει είναι η μεγάλη δια- και ενδο-οικογενειακή ετερογένεια με την οποία εμφανίζεται η ασθένεια όσον αφορά την ηλικία έναρξης, τη βαρύτητα και τη συχνότητα των επεισοδίων, τα ερεθίσματα που πυροδοτούν τις κρίσεις, την εντόπιση του οιδήματος και τα πρόδρομα σημεία και συμπτώματα. Ορισμένοι ασθενείς υποφέρουν από απειλητικές για τη ζωή κρίσεις με αποδεδειγμένη ανθρωπιστική και οικονομική επιβάρυνση, ενώ άλλοι εκδηλώνουν μια ήπια παρεία νόσου με το 14% των φορέων μεταλλάξεων στο *SERPING1* να παραμένουν ελεύθεροι συμπτωμάτων σε όλη τη ζωή.¹⁴⁴ Ένα 5% των ενηλίκων με ανεπάρκεια C1-INH ταυτοποιείται μόνο μετά την διάγνωση στους απογόνους και παρά το ότι μεταδίδουν τη μετάλλαξη στα παιδιά τους, παραμένουν ασυμπτωματικοί. Αρκετές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην ανακάλυψη κοινών πολυμορφισμών του *SERPING1* και/ή αλλαγών σε άλλα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Στη μεγαλύτερη μελέτη πάνω σε αυτό το πεδίο έως τώρα, οι Speletas et al εξέτασαν 265 ασθενείς με C1-INH-ΚΑΟ από τέσσερις ευρωπαϊκές χώρες, αποκαλύποντας πως οι ασθενείς που φέρουν παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στο *SERPING1* εμφανίζουν μικρότερη πιθανότητα κρίσεων πριν την ηλικία των 10 ετών συγκριτικά με ασθενείς που φέρουν όλα τα υπόλοιπα είδη μεταλλάξεων. Όπως ήταν αναμενόμενο παρατηρήθηκαν γεωγραφικές διαφορές στις κλινικές εκδηλώσεις. Οι ρουμάνοι ασθενείς εμφάνιζαν καθυστερημένη έναρξη της νόσου συγκριτικά με άλλες γεωγραφικές ομάδες. Οι ούγγροι ασθενείς εμφάνιζαν λιγότερο συχνά γαστρεντερικές κρίσεις ενώ μακροχρόνια θεραπεία φαίνεται πως χορηγείται συχνότερα στους Έλληνες συγκριτικά με τις άλλες γεωγραφικές ομάδες. Το 15.5% των μελών των οικογενειών ασθενών που εξετάστηκαν ήταν φορείς αλλαγών στο γονίδιο *SERPING1* χωρίς συμπτωματολογία της νόσου. Αυτό το εύρημα προσδίδει επιπλέον στοιχεία ότι οι αλλαγές στο *SERPING1* δεν είναι οι μόνες που ευθύνονται για την φαινοτυπική εκδήλωση της νόσου.¹⁴⁵ Οι Duponchel et al έδειξαν ότι η επιμόλυνση κυττάρων με μινιγονιδιακές κατασκευές φέρουσες το C αλληλόμορφο στη θέση c.-21, οδηγούσε συστηματικά στην δημιουργία ενός ασθενούς προϊόντος με έλλειψη του εξονίου 2 στις επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές, προτείνοντας ότι αυτό το αλληλόμορφο συνεισφέρει στη μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση και επακόλουθα στην έκφραση ενός βαρύτερου φαινοτύπου.¹⁴⁶ Οι Duan et al. παρατήρησαν ότι ο πολυμορφισμός C-2399A (rs3788853) στο γονίδιο *XPNPEP2* που κωδικοποιεί την APP, σχετίζεται με μείωση της λειτουργικότητάς της και αυξημένη επίπτωση ACEi-EAO.¹⁴⁷ Ο πολυμορφισμός rs989692 του ιντρονίου 1 στο γονίδιο της νεπριλυσίνης (ουδέτερη ενδοπεπτιδάση, NEP) *MME*, έχει συσχετιστεί επίσης με αυξημένη επίπτωση ACEi-EAO.¹⁴⁸ Καμία συσχέτιση δεν προέκυψε μεταξύ της βαρύτητας του C1-INH-ΚΑΟ και λειτουργικών πολυμορφισμών στα γονίδια *BDKR1*, *ACE* και *MBL2*.¹⁴⁹ Ο λειτουργικός πολυμορφισμός *FXII*-46C/T (rs1801020) ο οποίος οδηγεί σε μειωμένη επάρκεια της μετάφρασης και χαμηλά ποσοτικά επίπεδα και δραστικότητα του FXII¹⁵⁰ μπορεί να επηρεάσει τη φαινοτυπική έκφραση των ασθενών με ΚΑΟ όπως παρουσιάστηκε από τον Bors et al.¹⁵¹ Οι φορείς του *FXII*-46C/T εμφανίζουν καθυστερημένη έναρξη της νόσου και χρειάζονται λιγότερο τη μακροχρόνια θεραπεία. Αυτό το γεγονός μπορεί να αποδοθεί στη επίδραση που έχει ο πολυμορφισμός στη σύνθεση του FXII. Ο Gordon et al ανέφερε ότι τα επίπεδα του FXII στους Ανατολικούς πληθυσμούς ήταν περίπου τα μισά συγκριτικά με εκείνα των Καυκάσιων. Η συχνότητα αλληλομόρφου 46C/T εκτιμάται ότι είναι 0.27/0.73 στους Ανατολικούς πληθυσμούς

και αντίθετα, 0.8/0.2 στους Καυκάσιους. Ο πολυμορφισμός *FXII-46C/T* εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή του *FXII* στο π.46 και δημιουργεί ένα νέο κωδικόνιο έναρξης μεταγραφής του mRNA. Η αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης οδηγεί σε ελλειμματική πρωτεΐνη. Το T αλληλόμορφο καταστρέφει την αλληλουχία Kozak (GCCAGCCATGG) που σηματοδοτεί την έναρξη της μετάφρασης εμποδίζοντας την αναγνώριση της σωστής θέσης έναρξης της μετάφρασης.^{150,152} Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε μελέτη των Speletas et al. σε 258 ασθενείς με C1-INH-KAO από 113 μη συγγενείς ευρωπαϊκές οικογένειες. Η παρουσία του πολυμορφισμού *FXII-46C/T* συσχετίστηκε με καθυστέρηση 7 ετών στην έναρξη της νόσου ανεξάρτητα από το είδος της μετάλλαξης που φέρει το *SERPING1* και έτσι έχει χαρακτηριστεί ως ένας λειτουργικός πολυμορφισμός που αποτελεί ανεξάρτητο τροποποιητικό παράγοντα της βαρύτητας της νόσου.¹⁵³ Οι Charignon et al έδειξαν ότι η αυθόρμητη δραστηριότητα αμιδάσης και η δραστικότητα των ACE και CPN τόσο σε ασθενείς με μετάλλαξη στον FXII, όσο και σε ασυμπτωματικούς φορείς και μέλη των οικογενειών που δεν νοσούσαν ανευρέθησαν μειωμένες συγκριτικά με τους υγιείς εθελοντές. Υποθετικά, αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι η παραγωγή BK σε οικογένειες που φέρουν μετάλλαξη στον FXII ενισχύεται από ένζυμα τα οποία επηρεάζουν το σχηματισμό και αποδόμηση των κινινών. Αυτό είναι συμβατό με την ύπαρξη μιας μονογονιδιακής ασθένειας η οποία δέχεται κληρονομούμενες τροποποιητικές γονιδιακές επιδράσεις.¹⁵⁴ Οι προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στην ανεύρεση μετρήσιμων βιολογικών δεικτών της βαρύτητας της νόσου οι οποίοι μπορούν να συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότερη διαχείριση της. Πράγματι, η πρώτη αναφορά στην ύπαρξη βιολογικής συσχέτισης με τη βαρύτητα της νόσου τοποθετείται 10 χρόνια πίσω. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης των Adam et al η πλειοψηφία των ασθενών με ΚΑΟ επιδεικνύουν χαμηλά επίπεδα APP δραστηριότητας.¹⁵⁵ Αυτά τα χαμηλά επίπεδα δραστικότητας θα μπορούσαν να σχετίζονται με αυξημένη επιρρέπεια σε κρίσεις αγγειοσιδήματος.¹⁵⁶ Επιπλέον η ευρεία διακύμανση της APP δραστικότητας, μερικώς καθοριζόμενης από γενετικούς παράγοντες, όπως η παρουσία SNPs κατά μήκος του *APP* γονιδίου, θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην ποικιλομορφία της έκφρασης της νόσου.⁵ Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω υποθέσαμε ότι λειτουργικοί πολυμορφισμοί σε άλλα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στο μεταβολισμό της BK μπορεί να σχετίζονται με την βαρύτητα του C1-INH-KAO. Από τους πολυμορφισμούς οι οποίοι έχουν περιγραφεί ως λειτουργικοί επιλέξαμε να διερευνήσουμε τη συσχέτιση του πολυμορφισμού 428G/A (rs3733402) του *KLKB1*, ο οποίος εντοπίζεται στο εξόνιο 5 και οδηγεί στην αντικατάσταση Asn143Ser. Το γονίδιο κωδικοποιεί την PK, μια πρωτεάση σερίνης που αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του συστήματος επαφής και αναστέλλεται κυρίως από τον C1-INH και υπάρχουν ισχυρά στοιχεία ότι αυτή η αμινοξική αντικατάσταση σχετίζεται με λειτουργικές συνέπειες, όπως προαναφέρθηκε. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας διερευνήθηκε η σχέση του με φαινοτυπικά χαρακτηριστικά βαρύτητας της νόσου και επιπλέον, εξετάστηκε η συνδυαστική επίδραση της φορείας του με τον πολυμορφισμό *FXII-46C/T* (rs1801020), ο οποίος προηγουμένως έχει χαρακτηριστεί ως ανεξάρτητος παράγοντας βαρύτητας της νόσου καθώς έχει συσχετισθεί με την ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Διακόσιοι σαράντα εννέα ασθενείς (116 άνδρες και 133 γυναίκες) με C1-INH-KAO (221 τύπου I και 28 τύπου II) από 114 μη συγγενείς οικογένειες (37 Ελληνικές, 12 Γερμανικές, 19 Ρουμάνικες και 46 Ουγγρικές οικογένειες) προηγουμένως τυποποιημένες για το γονίδιο *SERPING1* και τον πολυμορφισμό *F12-46C/T*, συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τον πληθυσμό αποτέλεσαν 86 Έλληνες, 16 Ρουμάνοι, 28 Γερμανοί και 119 Ούγγροι. Η μέση ηλικία έναρξης της νόσου ήταν τα 9,8 έτη (εύρος 1-70). Η ηλικία γενετικής ανάλυσης (μέσος±τυπική απόκλιση) ήταν τα 37.7±18.0 έτη. Η ηλικία δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ασθενών με βάση το φύλο ή την εθνικότητα.

Το ιατρικό ατομικό αναμνηστικό περιελάμβανε πληροφορίες σχετικά με την έναρξη της νόσου, την ηλικία διάγνωσης και γενετικής ανάλυσης, τις κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις καθώς και την ανάγκη λήψης ή μη μακροχρόνιας θεραπείας. Ο ετήσιος αριθμός επεισοδίων δεν λήφθηκε ως κριτήριο βαρύτητας της νόσου εξαιτίας της συμμετοχής ασθενών υπό μακροχρόνια θεραπεία, γεγονός που θα οδηγούσε σε σημαντική υποεκτίμηση του αποτελέσματος.

Σχετικά με τους ασθενείς υπό μακροχρόνια θεραπεία εξαιτίας επαναλαμβανόμενων επεισοδίων, στεροειδή αναβολικά όπως η δαναζόλη υπερισχύουν στην Ελλάδα, τη Ρουμανία και την Ουγγαρία, ενώ στη Γερμανία ετός των αναβολικών στεροειδών, το τρανεξαμικό οξύ και ο ανθρώπινος C1-INH (Cinryse). Συμπύκνωμα ανθρώπινου C1-INH (Berinert PR, CSL Behring), ή icatibant (Firazyr, Shire) ελάμβαναν οι ενήλικοι ασθενείς σε περίπτωση σοβαρών κρίσεων που περιελάμβαναν απόφραξη αεραγωγών ή οξύ κοιλιακό άλγος. Οι παιδιατρικοί ασθενείς ελάμβαναν μόνο κεκαθαρμένο συμπύκνωμα C1-INH κατά τη διάρκεια των κρίσεων. Η απόφαση για τις θεραπευτικές επιλογές βασίστηκε στην εμπειρία του εκάστοτε κλινικού ιατρού σύμφωνα με τον διεθνή αλγόριθμο για τη διαχείριση των ασθενών με C1-INH-KAO. Η συγκατάθεση για την συμμετοχή των ασθενών λήφθηκε γραπτώς είτε από τους ίδιους είτε από τον αρμόδιο ενήλικα.

Πίνακας 3. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και φαινοτυπικοί παράμετροι που αξιολογήθηκαν.

	Σύνολο	Έλληνες	Ρουμάνοι	Γερμανοί	Ούγγροι
Αριθμός (οικογένειες, ασθενείς)	114, 249	37, 86	12, 16	19, 28	46, 119
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	116/133	45/41	6/10	13/15	52/67
Ηλικία ανάλυσης (μέση τιμή, εύρος)	36.0 (1-82)	36.0 (1-82)	37.0 (10-65)	37.5 (13-81)	37.0 (9-82)
Ηλικία έναρξης (μέση τιμή, εύρος)	10.0 (1-57)	10.0 (1-57)	11.0 (2-53)	10.0 (3-28)	10.0 (1-53)
Ηλικία διάγνωσης (μέση τιμή, εύρος)	22.0 (1-78)	22.0 (2-78)	21.0 (10-62)	18.0 (3-78)	21.0 (1-69)
Καθυστέρηση διάγνωσης (μέση τιμή, εύρος)	8.0 (0-72)	17.3 (0-58)	2.0 (0-52)	2.5 (0-72)	7.5 (0-60)
Ασυμπτωματικοί ασθενείς (n, %)	14 (5.6)	8 (9.3)	1 (6.2)	0	5 (4.2)
Ηλικία (μέση τιμή, εύρος)	10.0 (1-72)	4.5 (1-16)	45.0	0	42.0 (3-72)
Οικογένειες με ΚΑΟ τύπου II (αριθμός, %)	12 (10.5)	4 (10.8)	1 (8.3)	2 (10.5)	4 (8.7)
Ασθενείς με ΚΑΟ τύπου II (αριθμός, %)	28 (11.2)	13 (15.1)	2 (12.5)	3 (10.7)	10 (8.4)
Ασθενείς με λαρυγγικές κρίσεις (αριθμός, %)	139 (57.4)	44 (57.9)	12 (63.2)	13 (46.4)	70 (59.3)
Ασθενείς με κρίσεις στην κοιλιακή χώρα Σπάνιες (n,%)	102(40.9)	20(23.3)	1(6.2)	6(21.4)	75(63.0)
Κοινές (n,%)	82(32.9)	33(38.4)	8(50.0)	16(57.1)	25(21.0)
Κυρίως (n,%)	50(20.1)	25(29.1)	6(37.5)	5(17.9)	14(11.8)
Ασθενείς σε μακροχρόνια θεραπεία (n,%)	99 (42.3)	37 (47.4)	3 (20.0)	12 (42.9)	47 (41.2)

* Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς με μεταλλάξεις του *SERPING1* αποκλείστηκαν από τη στατιστική ανάλυση.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού έγινε με τη χρήση του ειδικού συστήματος, PureLink Genomic DNA Kit, σε αυτοματοποιημένο σύστημα εκχύλισης γενομικού DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στην απομόνωση του γενετικού υλικού από εμπύρηνια λευκοκύτταρα και στον περαιτέρω καθαρισμό του από πρωτεΐνες και άλατα στα επόμενα στάδια. Επιτυγχάνεται η απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων στοιχείων, που μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και περιεκτικότητα του DNA και κατ' επέκταση να παρεμποδίσουν πιθανά την PCR. Η συγκέντρωση του τελικού DNA ήταν περίπου 100-200 ng/μL ανάλογα με την ποιότητα του αρχικού δείγματος. Τα δείγματα DNA μπορούσαν

να διατηρηθούν στους 4°C για λίγες μέρες ή σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ 5 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ KLKB1 ΜΕΣΩ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μέθοδος με ευρεία εφαρμογή στη διάγνωση γενετικών νοσημάτων. Επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γενωμικό DNA. Τα άκρα του τμήματος που πολλαπλασιάζεται οριοθετούνται με την επιλογή δύο ολιγονουκλεοτιδίων που λειτουργούν σαν εκκινητές. Στην αντίδραση λαμβάνει χώρα πολυμερισμός με τη χρήση DNA πολυμεράσης που συνθέτει συμπληρωματική έλικα DNA με κατεύθυνση 5'→3'. Η αντίδραση γίνεται σε όγκο 20-50μl και απαιτεί δεσοξυριβοτριφωσφορικά νουκλεοτίδια, ειδικό διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου και ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο υπάρχουν όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη σωστή λειτουργία της πολυμεράσης.

Η αντίδραση PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του υποστρώματος

2. Σύνδεση των εκκινητών

3.Επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών.

Στο τέλος κάθε κύκλου το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή αποτελεί υπόστρωμα για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο που ξαναρχίζει με αποδιάταξη του DNA. Μια συνηθισμένη αντίδραση PCR περιλαμβάνει 25-35 κύκλους. Με κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορεί να πολλαπλασιαστεί οποιοδήποτε τμήμα DNA του οποίου η αλληλουχία είναι γνωστή.

2.2.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκε η κλασική αντίδραση πολυμεράσης. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, που αντλήθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία, οι οποίοι αποσκοπούσαν στη μελέτη συγκεκριμένου αναγνωστικού πλαισίου, όπου εδράζεται ο εν λόγω πολυμορφισμός. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Katsuda et al με τροποποιήσεις.¹²⁸ Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η ακριβής αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης καθώς και το μήκος του προϊόντος του γονιδίου *KLKB1* που αναμένεται μετά την ενίσχυση.

Πίνακας 4: Εκκινητές για την ενίσχυση του εξονίου 5

Πολυμορφισμός	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μήκος(bp)	Μήκος(bp) προϊόντος PCR
428G/A	Πρόσθιος	AACCCAAATGGTAG TGGGTA	20	432
	Οπίσθιος	AGCGCGACTCCATC TCAATA	20	

2.2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενωμικού DNA που ενισχύθηκαν σε αντίδραση PCR συνολικού όγκου 30 µl που περιείχε 200 µM από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 30 pmoles από τον κάθε εκκινητή, 1.5 mM MgCl₂ και 1.0 U του ενζύμου Taq πολυμεράση (Invitrogen, Thermofisher, USA) σε ρυθμιστικό διάλυμα 10X το οποίο παρείχε ο κατασκευαστής. Στον Πίνακα 6 παρατίθενται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Οι συνθήκες της αντίδρασης επαναλήφθηκαν για 35 κύκλους. Οι αντιδράσεις PCR διενεργήθηκαν σε αυτόματο κυκλικό θερμομετατροπέα Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermofisher, USA), ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων τηρήθηκαν όλα τα απαραίτητα μέτρα για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Σε κάθε πείραμα συμμετείχε σωληνάριο μάρτυρας χωρίς προσθήκη γενετικού υλικού (blank), ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Το προϊόν της αντίδρασης PCR εμφανίζει μια ζώνη μεγέθους 432 bp μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%.

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια για την ενίσχυση του εξονίου 5

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (µl)
H ₂ O	235
10xPCR buffer	50
dNTP Mix	40
MgCl ₂ (1,5mM)	15
Νοηματικός εκκινητής (30pmol)	10
Αντι-νοηματικός εκκινητής (30pmol)	10

Πίνακας 6. Κατάλληλες συνθήκες για την ενίσχυση του εξονίου 5

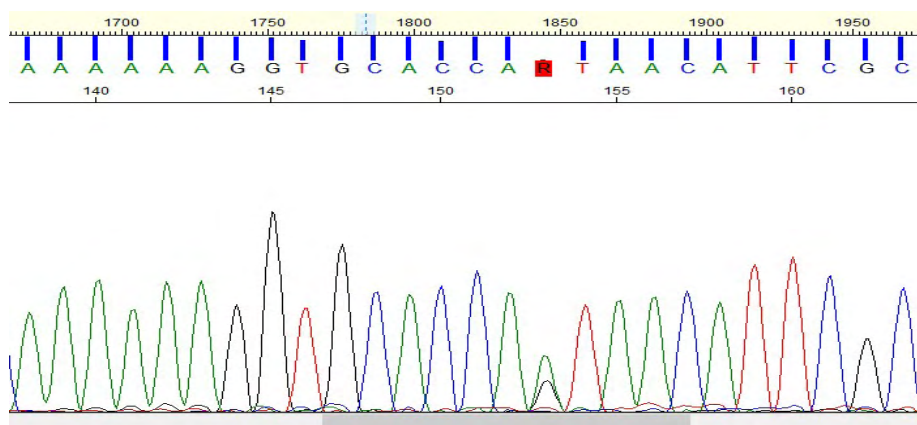
Στάδιο	Πολυμορφισμός	
	G428A	
	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	95°C	5min
Αποδιάταξη (Denaturation)	95°C	30sec
Υβριδισμός (Annealing)	55°C	1min
Επέκταση (Extension)	72°C	1min
Τελική επέκταση (Final Extension)	72°C	5min
Κύκλοι	35	

2.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

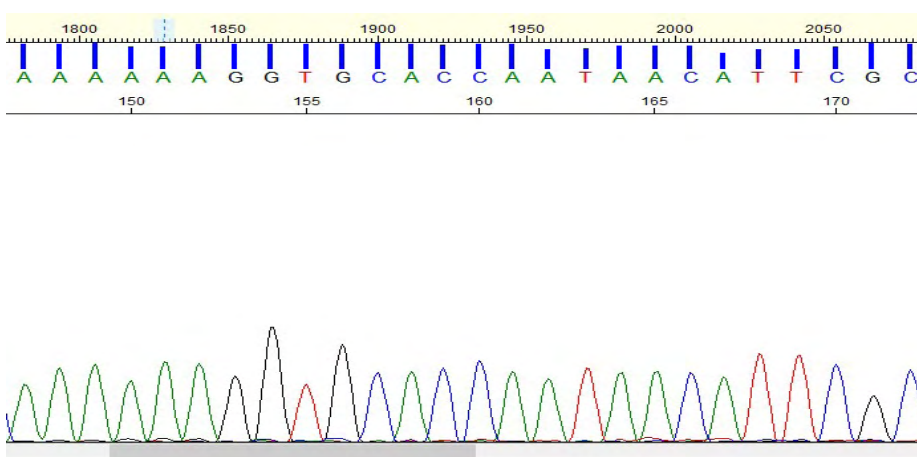
Τα παραγόμενα PCR προϊόντα καθαρίστηκαν με τη χρήση του USB ExoSAP-IT συστήματος καθαρισμού προϊόντων PCR (Affymetrix Inc, USA). Τα αντιδραστήρια του ExoSAP-IT είναι κατάλληλα για PCR προϊόντα που κυμαίνονται μεταξύ μεγέθους λιγότερο από 100 bp έως 20 kb χωρίς σημαντική απώλεια προϊόντος κατά την απομάκρυνση εκκινητών και νουκλεοτιδίων. Μετά το τέλος της PCR το ExoSAP-IT εφόσον διατηρήθηκε στον πάγο καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, προστέθηκε κατευθείαν στην αντίδραση. Συγκεκριμένα, 5μl από το διάλυμα της PCR αντίδρασης αναμείχθηκαν με 2μl από το ExoSAP-IT αντιδραστήριο. Μετά την επώαση για 15 λεπτά στους 37°C για απομάκρυνση εκκινητών και νουκλεοτιδίων, το αντιδραστήριο απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 80°C για 15 λεπτά. Τα προϊόντα ήταν έπειτα έτοιμα να χρησιμοποιηθούν ή αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την πραγματοποίηση της ανάλυσης της αλληλουχίας τους.

2.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

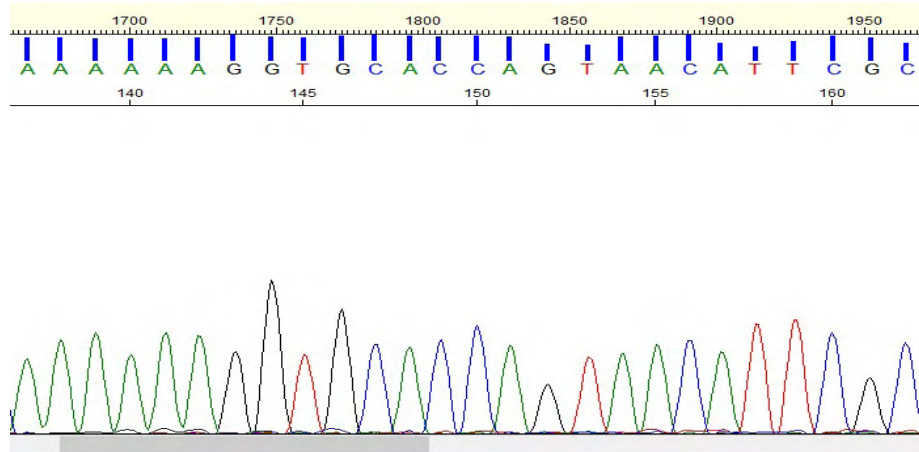
Τα κεκαθαρμένα PCR προϊόντα αλληλουχήθηκαν με τη χρήση αναλυτή 48-capillary 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Thermofisher, USA) και ενός συστήματος αλληλούχησης BigDye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems).



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση ασθενούς ετερόζυγου για τον πολυμορφισμό *KLKB1*-428G/A



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση ασθενούς ομόζυγου για το A αλληλόμορφο του *KLKB1*-428G/A



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση ασθενούς ομόζυγου για το G αλληλόμορφο του *KLKB1*-428G/A

3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κατάλληλα στατιστικά τεστ χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Οι κατηγορικές μεταβλητές αναλύθηκαν με το Fisher's exact test. Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκε με το Kolmogorov-Smirnov test. Τα δεδομένα με κανονική διασπορά αναλύθηκαν με τα Student's t-test και one-way ANOVA κατά περίπτωση. Τα αποκλείοντα δεδομένα αναλύθηκαν με μη παραμετρικές μεθόδους (Mann-Whitney test ή Kruskal-Wallis test ανάλογα με την περίπτωση). Δεδομένου όμως του γεγονότος ότι ο πληθυσμός αποτελούνταν από συσχετιζόμενα άτομα (μέλη των ίδιων οικογενειών), εφαρμόσαμε γενικευμένες εξισώσεις εκτίμησης (GEE), μια επέκταση των γενικών γραμμικών μοντέλων που υπολογίζει την διατομική συσχέτιση. Οι GEE χρησιμοποιήθηκαν για να περιγραφεί η συσχέτιση των μεταβλητών απόκρισης (ηλικία έναρξης, ανάγκη για μακροχρόνια προφυλακτική θεραπεία) με επεξηγηματικές μεταβλητές (εθνικότητα, φύλο, γονότυπος, τύπος C1-INH-KAO, κλινικές εκδηλώσεις όπως επεισόδια προσβολής του λάρυγγα ή της κοιλιάς). Η ηλικία έναρξης της νόσου διαμορφώθηκε ως συνεχής μεταβλητή στα γραμμικά GEE μοντέλα και η ανάγκη για μακροχρόνια προφυλακτική θεραπεία εισήχθη ως διαδυκνή μεταβλητή στα λογιστικά GEE μοντέλα. Σε όλα τα GEE μοντέλα χρησιμοποιήθηκε μία μη δομημένη δομή συσχετισμού και τα κριτήρια πληροφόρησης πιθανότητας Quasi (QIC) χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή του μοντέλου. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το SPSS 17.0 (IBM Corporation, NY, 2008). Για την ανάλυση, το όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε στο 0.05 (two-tailed).

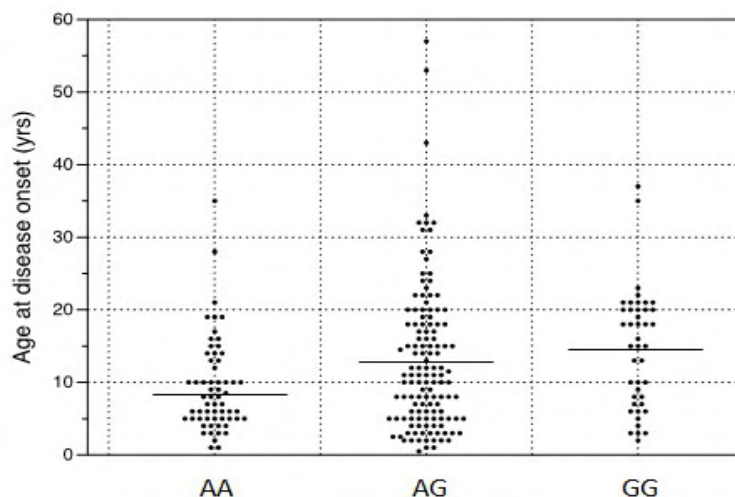
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι 138 ασθενείς ήταν ετερόζυγοι και οι 47 ομόζυγοι για το G αλληλόμορφο του *KLKB1*-428G/A πολυμορφισμού. (συχνότητα αλληλομόρφου 46.58%). Η επίπτωση του πολυμορφισμού *KLKB1*-428G/A δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των εθνικοτήτων.

Πίνακας 7. Συχνότητες φορείας των πολυμορφισμών ανά εθνικότητα

	Σύνολο	Έλληνες	Ρουμάνοι	Γερμανοί	Ούγγροι
<i>F12</i> -46 C/T, συχνότητα(%)	42(17.1)	9(10.5)	3(15.6)	8(26.8)	22(18.5)
<i>KLKB1</i> -428G/A συχνότητα(%)	116(46.6)	47(54.7)	9(53.8)	12(42.9)	49(40.8)
<i>F12</i> (+) <i>KLKB1</i> (+) συχνότητα(%)	59(23.7)	14(16.3)	3(18.8)	8(28.6)	34(28.6)
<i>F12</i> (+) <i>KLKB1</i> (-) συχνότητα(%)	18(7.2)	4(4.7)	1(6.3)	3(10.7)	10(8.4)
<i>F12</i> (-) <i>KLKB1</i> (+) συχνότητα (%)	126(50.6)	55(64.0)	10(62.5)	12(42.9)	49(41.2)
<i>F12</i> (-) <i>KLKB1</i> (-) συχνότητα(%)	46(18.4)	13(15.1)	2(12.5)	5(17.9)	26(21.8)

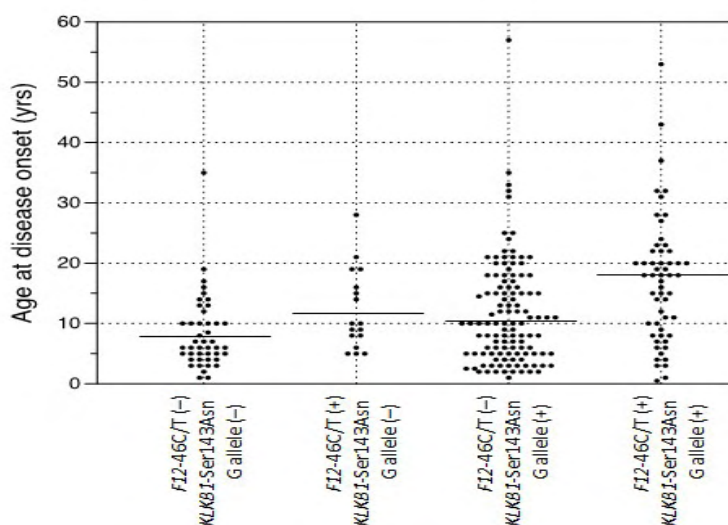
Σε ένα GEE γραμμικό αναδρομικό μοντέλο με την ηλικία έναρξης ως εξαρτημένη μεταβλητή, η φορεία του G αλληλομόρφου του *KLKB1*-428G/A πολυμορφισμού συσχετίστηκε σημαντικά με καθυστέρηση στην έναρξη της νόσου κατά 4.1 έτη ($p < 0.001$) προσαρμοσμένη ως προς το φύλο και την εθνικότητα. Αυτή η επίδραση εμφανίζει αυξανόμενη τάση αναφορικά με τη G ζυγωτία, πιο συγκεκριμένα, συγκριτικά με τους ασθενείς αγρίου τύπου (AA), οι GG ομοζυγώτες εμφάνισαν καθυστέρηση κατά 4.3-έτη ($p = 0.003$) ενώ οι AG ετεροζυγώτες εμφάνισαν καθυστέρηση κατά 3.3-έτη στην εμφάνιση της νόσου ($p = 0.002$).



Εικόνα 20. Μέση ηλικία έναρξης της νόσου με βάση τη ζυγωτία του G αλληλομόρφου του πολυμορφισμού *KLKB1*-428G/A.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς που έφεραν ταυτόχρονα το G αλληλόμορφο του *KLKB1*-428G/A και τον *FXII*-46C/T πολυμορφισμό εμφανίζουν επιπλέον καθυστέρηση στην εκδήλωση της νόσου. Ειδικότερα, όταν μελετήθηκε η συνδυαστική επίδραση της φορείας των πολυμορφισμών *KLKB1*-428G/A και *FXII*-46C/T σε σχέση με τους ασθενείς που δεν έφεραν

καμία από αυτές τις αλλαγές, οι φορείς του *FXII*-46C/T πολυμορφισμού εμφάνισαν καθυστέρηση 3.9 ετών ($p=0.03$), εκείνοι οι οποίοι έφεραν το G αλληλίο του *KLKB1*-428G/A πολυμορφισμού παρουσίασαν καθυστέρηση 3.3 ετών ($p=0.006$) και οι φορείς και των δύο πολυμορφισμών παρουσίασαν καθυστέρηση στην εκδήλωση της νόσου κατά 8.8 έτη ($p<0.001$).



Εικόνα 20. Μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων με βάση την παρουσία κάθε πολυμορφισμού ανεξάρτητα και σε συνδυασμό

Οι δύο πολυμορφισμοί δεν βρίσκονται σε σημαντική ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους. Καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ του είδους της μετάλλαξης του *SERPING1* ή του τύπου C1-INH-KAO με την ηλικία έναρξης της νόσου. Ούτε η παρουσία του *KLKB1*-428G/A πολυμορφισμού, ούτε η αλληλεπίδραση του με την ταυτόχρονη παρουσία του πολυμορφισμού στο *FXII* έδειξαν σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση λαρυγγικών προσβολών ή την ανάγκη για λήψη μακροχρόνιας προφυλακτικής θεραπείας. Παρατηρήθηκε η τάση των ασθενών που φέρουν και τους δύο πολυμορφισμούς να εμφανίζουν κατά 64% μειωμένη πιθανότητα για μακροχρόνια θεραπεία συγκριτικά με τους ασθενείς οι οποίοι δεν έφεραν το G αλληλίο ($OR=0.36$, 95% CI 0.15 – 0.85, $p=0.019$).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αρκετά στοιχεία δείχνουν ότι το ΚΑΟ εμφανίζει μια μεγαλύτερη γενετική πολυπλοκότητα από ότι αναμενόταν αρχικά. Πέρα από τις αλλαγές στο γονίδιο *SERPING1* οι οποίες οδηγούν σε ανεπάρκεια C1-INH, αλλαγές οι οποίες οδηγούν στο ΚΑΟ με φυσιολογικό C1-INH έχουν εντοπισθεί στο γονίδιο του *FXII*^{154,157} και πρόσφατα στο γονίδιο *ANGPT1* που κωδικοποιεί την αγγειοποιητίνη-1, η οποία στοχεύει μηχανισμούς που συνεισφέρουν στη διατήρηση της ομοιόστασης της λειτουργίας του ενδοθηλιακού φραγμού,⁵⁹ όπως επίσης και στο γονίδιο *PLG* που κωδικοποιεί το πλασμινογόνο.^{55,158} Όσον αφορά στην κλινική εκδήλωση του C1-INH-KAO, έχει δειχθεί ότι η φορεία παραρμηνεύσιμων μεταλλάξεων του *SERPING1*^{145,151} ή του λειτουργικού πολυμορφισμού του υποκινητή, *FXII*-46C/T (rs1801020) σχετίζονται με μια λιγότερο βαριά κλινική πορεία της νόσου.¹⁵³

Βασιζόμενοι σε αυτά τα στοιχεία, υποθέσαμε ότι λειτουργικές αλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν άλλες πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στο μεταβολισμό και τη λειτουργία της

βραδυκινίνης, μπορεί να επηρεάσουν τον κλινικό φαινότυπο και πιθανώς να συνεισφέρουν στην παθογένεια του C1-INH-KAO. Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής επιβεβαιώνουν αυτή την υπόθεση δείχνοντας ότι οι φορείς του πολυμορφισμού *KLKB1*-428G/A επιδεικνύουν μια στατιστικά σημαντική καθυστέρηση στην έναρξη της νόσου κατά 4,1 έτη, γεγονός το οποίο εξαρτάται από την κατάσταση ζυγωτίας, ενώ οι ασθενείς που φέρουν συνδυαστικά τους πολυμορφισμούς *KLKB1*-428G/A και *FXII*-46C/T εμφάνισαν μεγαλύτερη καθυστέρηση στην έναρξη της νόσου και σημαντικά μειωμένη ανάγκη προς χορήγηση μακροχρόνιας προφυλακτικής θεραπείας.

Αυτές οι συσχετίσεις του *KLKB1*-428G/A πολυμορφισμού μπορούν να αποδοθούν στη λειτουργικότητά του. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη βρίσκεται στην περιοχή Apple 2 της βαριάς αλυσίδας της PK και οδηγεί σε μείωση του σχηματισμού των συμπλόκων PK-HK. Το HK αποτελεί την πρωτεΐνη πρόσδεσης της PK στο πλάσμα και σε κυτταρικές μεμβράνες και συμβάλλει στη βέλτιστη ενεργοποίηση της PK και επακόλουθα στο σχηματισμό BK. Το G αλλήλιο τροποποιεί μία θέση γλυκοζυλίωσης στην PK γεγονός το οποίο μειώνει την ικανότητά της να δεσμεύει το HK, μια σημαντική αλληλεπίδραση η οποία προστατεύει την καλρικρεΐνη του πλάσματος από την αναστολή μέσω του C1-INH. Επιπλέον, δεδομένου του γεγονότος ότι η PK μετατρέπει την προρενίνη σε ρενίνη, παρά το χαμηλό pH,¹⁵⁹ αυτός ο πολυμορφισμός φαίνεται να σχετίζεται με διαταραχές του ενζυμικού μονοπατιού και μείωση του σχηματισμού δραστικής ρενίνης.¹³² Τελικά, ο πολυμορφισμός εμφανίζει σημαντική συσχέτιση με την ET-1 και την ADM,¹³⁴ και με μειωμένη πιθανότητα ύπαρξης ιστορικού καρδιαγγειακής νόσου.¹⁶⁰ Με βάση όσα είναι γνωστά για τη λειτουργικότητα του πολυμορφισμού *FXII*-46C/T, βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή του *FXII* γονιδίου και δημιουργεί ένα νέο κωδικόνιο έναρξης για τη μεταγραφή του mRNA και η επακόλουθη αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης παράγει μια ελειμματική πρωτεΐνη. Το T αλληλόμορφο καταστρέφει την αλληλουχία του Kozak (GCCAGCCATGG) οδηγώντας σε μειωμένη επάρκεια της μετάφρασης και χαμηλά επίπεδα FXII πιθανώς επηρεάζοντας την παραγωγή BK.¹⁵⁰

Εάν εκτιμηθούν κατάλληλα σε μεγαλύτερες σειρές ασθενών οι πολυμορφισμοί *KLKB1*-428G/A και *FXII*-46C/T μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμοι ως προγνωστικοί γενετικοί βιοδείκτες για την ηλικία έναρξης της νόσου, ειδικά σε απογόνους ελεύθερους συμπτωμάτων οι οποίοι φέρουν την ίδια μετάλλαξη στο *SERPING1* με το γονέα ο οποίος πάσχει από C1-INH-KAO. Επιπλέον, δεδομένου ότι η πρόωμη έναρξη συμπτωμάτων συσχετίζεται αντιστρόφως με την επακόλουθη πορεία της νόσου, και τελικά με την ανάγκη χορήγησης μακροχρόνιας προφυλακτικής θεραπείας,^{11,42} αυτοί οι πολυμορφισμοί μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμοι γενετικοί βιοδείκτες της βαρύτητας της νόσου, ένα ζήτημα το οποίο έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της σύγχρονης έρευνας πάνω στο αγγειοίδημα.¹⁶¹ Σε κάθε περίπτωση η συγκεκριμένη μελέτη, όπως και κάθε άλλη μελέτη πάνω στην προσπάθεια ανεύρεσης βιοδεικτών της βαρύτητας του C1-INH-KAO έρχεται αντιμέτωπη με το πρόβλημα της υποκειμενικής αξιολόγησης της βαρύτητας της νόσου. Παρόλα αυτά, τα συμπεράσματα της παρούσας πτυχιακής προσδίδουν ακόμα ένα στοιχείο πάνω στη λειτουργικότητα του *KLKB1*-428G/A πολυμορφισμού το οποίο θα άξιζε να διερευνηθεί περαιτέρω.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. DONALDSON VH, EVANS RR. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: absence of serum inhibitor of C1 esterase. *Am J Sc* 1963;31:37–44.
2. MANSI M, ZANICHELLI A, COEREZZA A, SUFFRITTI C, WU MA, VACCHINI R, STIEBER C, CICHON S, CICARDI M. Presentation, diagnosis and treatment of angioedema without wheals: a retrospective analysis of a cohort of 1058 patients. *J Int Med* 2015 Vol 277 Issue 5 p.585–593.
3. LONGHURST H, CICARDI M. Hereditary angioedema. *Lancet* 2012;379:474–481.
4. BORK K, BARNSTEDT SE, KOCH P, TRAUPE H. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet* 2000;356:213–217.
5. CICHON S, MARTIN L, HENNIES HC, MULLER F, VAN DRIESSE K, KARPUSHOVA A, STEVENS W, COLOMBO R, RENNÉ T, DROUET C, BORK K, NÖTHEN MM. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet* 2006;79:1098–1104.
6. CICARDI M, ZANICHELLI A. Acquired angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010;6:14.
7. ROBERTS JR, LEE JJ, MARTHERS DA. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor angioedema: the silent epidemic. *Am J Cardiol* 2012;109:774–5.
8. CICARDI M, BERGAMASCHINI L, ZINGALE LC, GIOFFRE D, AGOSTONI A. Idiopathic nonhistaminergic angioedema. *Am J Med* 1999;106:650–4.
9. CICARDI M, AGOSTONI A. Hereditary angioedema. *N Engl J Med* 1996;334: 1666–7.
10. CUGNO M, NUSSBERGER J, CICARDI M, AGOSTONI A. Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. *Int Immunopharmacol*. 2003;3:311–7.
11. BORK K, MENG G, STAUBACH P, HARDT J. Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *Am J Med* 2006;119:267–27.
12. FRIGAS E, PARK M. Idiopathic recurrent angioedema. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;26:739–751.
13. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, Johns Hopkins University, Baltimore, MD. OMIM Number: *606860. Last edited: 1/26/2009, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=606860>.
14. ZURAW B. *Cleveland journal of Medicine*, Volume 80, May 2013.
15. RIEDL M, GOWER RG, CHRVALA CA. Current medical management of hereditary angioedema: results from a large survey of US physicians. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011;106:316–322.
16. FÖRSTER T, MÜLLER CR, OLDENBURG J. Expression Analysis of C1-Inhibitor Mutants Confirms Causality of Missense Mutations for Hereditary Angioedema. *36th Hemophilia Symposium Hamburg 2005* pp:220–223.
17. HUBER R, CARRELL RW. Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* 1989 28:8951–8966.
18. CARRELL RW, LOMAS DA. Conformational disease. *Lancet* 1997;350:134–138.
19. CARTER PE, DUNBAR B, FOTHERGILL JE. Genomic and cDNA cloning of the human C1 inhibitor. Intron-exon junctions and comparison with other serpins. *Eur J Biochem* 1988 Apr 5;173(1):163–9.
20. CARTER PE, DUPONCHEL C, TOSI M, FOTHERGILL JE. Complete nucleotide sequence of the gene for human C1-inhibitor with an unusually high density of Alu elements. *Eur J Biochem* 1991 197:301–30.
21. QUASTEL M, HARRISON R, CICARDI M, ALPER CA, ROSEN FS. Behavior in vivo of normal and dysfunctional C1 inhibitor in normal subjects and patients with hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest* 1983;71:1041–1046.
22. BOCK SC, SKRIVER K, NIELSEN E, THOGERSEN HC, WIMAN B, DONALDSON VH, EDDY RL, MARRINAN J, RADZIEJEWSKA E, HUBER R, SHOWS TB, MAGNUSSON S. Human C1 inhibitor: Primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 1986 25:4292–4301.
23. LENER M, VINCI G, DUPONCHEL C, MEO T, TOSI M. Molecular cloning, gene structure and expression profile of mouse C1 inhibitor. *Eur J Biochem* 1998 254.
24. CUGNO M, BOS I, LUBBERS Y, HACK C, AGOSTONI A. In vitro interaction of C1-inhibitor with thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001 12:253.
25. HAN ED, MAC FARLANE RC, MULLIGAN AN, SCAFIDI J, DAVIS AE. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest* 2002;109:1057–63.
26. PAPPALARDO E, CACCIA S, SUFFRITTI C, TORDAI A, ZINGALE LC, CICARDI M. Mutation screening of C1 inhibitor gene in 108 unrelated families with hereditary angioedema: functional and structural correlates. *Mol Immunol* 2008;45:3536–3544.
27. TOSI M, CARUGATI A, HERNANDEZ C, BOUCONTET L, PAPPALARDO E, Agostoni A. De novo C1 inhibitor mutations in hereditary angioedema. *Mol Immunol* 1998;35:406–406.
28. BOWEN B, HAWK J, SIBUNKA S, HOVICK S, WEILER JM. A review of the reported defects in the human C1 esterase inhibitor gene producing hereditary angioedema including four new mutations. *Clin Immunol* 2001 98: 157.
29. BLANCH A, ROCHE O, URRUTIA I, GAMBOA P, FONTAN G, LOPEZ-TRASCASA M. First case of homozygous C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:1330–1335.
30. AMRANI N, SACHS MS, JACOBSEN A. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 7:415–425.

31. STOPPA-LYONNET D, CARTER P, MEO T, TOSI M. Clusters of intragenic Alu repeats predispose the human C1 inhibitor locus to deleterious rearrangements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 Vol. 87 pp.1551-55.
32. KALMAR L, HEGEDUS T, FARKAS H, NAGY M, TORDAI A. HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Hum Mutat* 2005; 25:1-5.
33. ROSEN FS, PENSKY J, DONALDSON V, CHARACHE P. Hereditary angioneurotic edema: two genetic variants. *Science* 1965; 148:957-958.
34. VERPY E, COUTURE-TOSI E, ELDERING E, LOPEZ-TRASCASA M, SPATH P, MEO T, TOSI M. Crucial residues in the carboxy-terminal end of C1 inhibitor revealed by pathogenic mutants impaired in secretion or function. *J Clin Invest* 1995 95: 350.
35. DONALDSON VH, ROSEN FS. Action of complement in hereditary angioneurotic edema: the role of C1-esterase. *J Clin Invest* 1964; 43:2204-2213.
36. AGOSTONI A, AYGOREN-PURSUN E, BINKLEY KE, BLANCH A, BORK K, BOUILLET L. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(Suppl 3):S51-S131.
37. WAGENAAR-BOS IG, DROUET C, AYGOREN-PURSUN E, BORK K, BUCHER C, BYGUM A. Functional C1-inhibitor diagnostics in hereditary angioedema: assay evaluation and recommendations. *J Immunol Methods* 2008; 338:14-20.
38. CABALLERO T, FARKAS H, BOUILLET L, BOWEN T, GOMPEL A, FAGERBERG C. International consensus and practical guidelines on the gynecologic and obstetric management of female patients with hereditary angioedema caused by C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129:308-320.
39. TARZI MD, HICKEY A, FORSTER T, MOHAMMADI M, LONGHURST HJ. An evaluation of tests used for the diagnosis and monitoring of C1 inhibitor deficiency: normal serum C4 does not exclude hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol* 2007; 149:513-516.
40. BOWEN T, CICARDI M, FARKAS H. International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010; 6:24.
41. FARKAS H. Pediatric hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010; 6:18.
42. FARKAS H, VARGA L, SZEPLAKI G, VISY B, HARMAT G, BOWEN T. Management of hereditary angioedema in pediatric patients. *Pediatrics* 2007; 120:713-722.
43. BINKLEY KE, DAVIS A. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:546-550.
44. BORK K, GUL D, DEWALD G. Hereditary angio-oedema with normal C1 inhibitor in a family with affected women and men. *Br J Dermatol* 2006; 154:542-545.
45. DEWALD G, BORK K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343:1286-1289.
46. ROYLE NJ, NIGLI M, COOL D, MACGILLIVRAY RT, HAMERTON JL. Structural gene encoding human factor XII is located at 5q33-qter. *Somat Cell Mol Genet* 1988 14:217.
47. MARCOS C, LOPEZ LERA A, VARELA S, LINARES T, ALVAREZ-EIRE MG, LOPEZ-TRASCASA M. Clinical, biochemical, and genetic characterization of type III hereditary angioedema in 13 Northwest Spanish families. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012; 109:195-200.
48. MAGNUSSON S, SOTTRUO-JENSEN L, PETERSEN TE, WOJCIECHOWSKA DG, CLAEYS H. Homologous "kringle" structures common to plasminogen and prothrombin. Substrate specificity of enzymes activating prothrombin and plasminogen. *Proteolysis and Physiological Regulation* vol 11 New York NY Academic 1976 p.203.
49. COOL DE, MAC GILLIVRAY RT. Characterization of the human blood coagulation factor XII gene. *J Biol Chem* 1987 262:13662.
50. BORK K, WULFF K, MEINKE P, WAGNER N, HARDT J, WITZKE G. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clin Immunol* 2011; 141:31-35.
51. KISS N, BARABAS E, VARNAI K, HALASZ A, VARGA LA, PROHASZKA Z. Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. *Clin Immunol* 2013; 149:142-145.
52. RIEDL MA. Hereditary Angioedema with Normal C1-INH. *J Allergy Clin Immunol*: In practice 2013 Vol 1 Issue 5 p 427-432
53. BORK K, KLEIST R, HARDT J, WITZKE G. Kallikrein-kinin system and fibrinolysis in hereditary angioedema due to factor XII gene mutation Thr309Lys. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20:325-32.
54. BORK K, GUL D, HARDT J, DEWALD G. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: clinical symptoms and course. *Am J Med* 2007; 120:987-992.
55. BORK K, WULFF K, STEINMÜLLER-MAGIN L, BRAENNE I, STAUBACH-RENTZ P, WITZKE G, HARDT J. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy* August 2017 p 1-9.
56. BAFFERT F, LE T, THURSTON G, McDONALD DM. Angiopoietin-1 decreases plasma leakage by reducing number and size of endothelial gaps in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 290: H107-H118.
57. JHO D, MEHTA D, AHMED G, GAO XP, TIRUPATHI C, BROMAN C, MALIK AB. Angiopoietin-1 Opposes VEGF-Induced Increase in Endothelial Permeability by Inhibiting TRPC1-Dependent Ca²⁺ Influx. *Circulation Research* June 24, 2005.

58. DAVIS S,PAPADOPOULOS S,ALDRICH TH,MAISONPIERRE PC,HUANG T,KOVAC L,XU A,LEIDICH R,RADZIEJEWSKA E,RAFIQUE A,GOLDBERG J,JAIN V,BAILEY K,KAROW M,FANDL J,SAMUELSSON SJ,IOFFE E, RUDGE JS,DALY TJ,RADZIEJEWSKI C,YANCOPoulos GD.Angiopoetins have distinct molecular domains essential for receptor binding, dimerisation and superclustering.*Nature Structure and Molecular Biology* 2002 10:38-44.
59. BAFUNNO V,FIRINU D,D'APOLITO M,CORDISCO G,LOFFREDO S,LECCESE A,BOVA M,BARCA MP,SANTACROCE R,CICARDI M,DEL GIACCO S,MARGAGLIONE M.Mutation of angiopoietin-1 gene associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2017.
60. MADEDDU P,EMANUELI C,VARONI MV,DEMONTIS MP,ANANIA V,GORIOSO N,CHAO J.Regulation of bradykinin B2-receptor expression by oestrogen.*British Journal of Pharmacology* 1997 121,1763-69.
61. NUSSBERGER J,CUGNO M,AMSTUTZ C,CICARDI M,PELLACANI A,AGOSTONI A.Plasma bradykinin in angioedema.*Lancet* 1998;351:1693-97.
62. MARTIN L.Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor gene in a family with affected women and men is associated with the p.Thr328Lys mutation in the F12 gene.*J Allergy Clin Immunol* 2007;120:975-7.
63. FRIGAS E,PARK M.Idiopathic recurrent angioedema.*Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26:739-751.
64. GOWER RG.Hereditary Angioedema Caused By C1-Esterase Inhibitor Deficiency:A Literature-Based Analysis and Clinical Commentary on Prophylaxis Treatment Strategies.*WAO Journal* February 2011 Supplement.
65. KEMP JG,CRAIG TJ.Variability of prodromal signs and symptoms associated with hereditary angioedema attacks: a literature review.*Allergy Asthma Proc* 2009;30:493-9.
66. BAKER JD.Challenges of hereditary angioedema in female patients.*The Female Patient* vol 37 February 2012.
67. BRICKMAN CM,TSOKOS GC,BALOW JE.Immunoregulatory disorders associated with hereditary angioedema. Clinical manifestations of autoimmune disease.*J Allergy Clin Immunol* 1986;77: 749-57.
68. BORK K,STAUBACH P,ECKARDT AJ,HARDT J.Symptoms, course, and complications of abdominal attacks in hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency.*Am J Gastroenterol* 2006;101:619-627.
69. BORK K,BARNSTEDT SE.Treatment of 193 episodes of laryngeal edema with C1 inhibitor concentrate in patients with hereditary angioedema.*Arch Intern Med* 2001 161:714-71.
70. AGOSTONI A,CICARDI M.Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency:biological and clinical characteristics in 235 patients.*Medicine* (Baltimore) 1992;71:206-215.
71. OHELA K.Hereditary angioneurotic oedema in Finland: clinical, immunological and genealogical studies.*Acta Med Scand* 1977;201:415-427.
72. LUNN ML,SANTOS CB,CRAIG TJ.Is there a need for clinical guidelines in the United States for the diagnosis of hereditary angioedema and the screening of family members of affected patients?*Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104:211-4.
73. ZURAW B.Recognizing and Managing Hereditary Angioedema.*Cleveland journal of Medicine* 2013 Volume 80 Number 5 p 297-308.
74. SCHMAIER AH.Assembly, activation and physiologic influence of the plasma kallikrein/kinin system.*Int Immunopharmacol* 2008;8:161-165.
75. RATNOFF OD,ROSENBLUM JM.Role of hageman factor in the initiation of clotting by glass.*American Journal of Medicine* August 1958 Volume 25 Issue 2 p160-168.
76. OGSTON D,OGSTON CM,RATNOFF OD,FORBES CD.Studies on a complex mechanism for the activation of plasminogen by kaolin and by chloroform: the participation of Hageman factor and additional cofactors, *Journal of Clinical Investigation* October 1969.
77. FAXÄLV L,BOKNÄS N,STRÖM JO,TENGVAL P,THEODORSSON E,RAMSTRÖM S,LINDAHL TL.Putting polyphosphates to the test:evidence against platelet-induced activation of factor XII.*Blood* 2013 122:3818-24.
78. OSCHATZ C,MAAS C,LECHER B,JANSEN T,BJÖRKQVIST J,TRADLER T,SEDLMEIER R,CICHON S,BURFEIND P, HAMMERSCHMIDT S,MÜLLER-ESTERL W,WUILLEMIN WA,NILSSON G,RENNÉ T.Mast Cells Increase Vascular Permeability by Heparin-Initiated Bradykinin Formation In Vivo.*Immunity* 2011 Volume 34 Issue 2 p.258-268.
79. SANCHEZ J,ELGUE G,LARSSON R,NILSSON B,OLSSON P.Surface-adsorbed fibrinogen and fibrin may activate the contact activation system.*Thrombosis Research* 2008 Volume 122 Issue 2 p 257-63.
80. VAN DER MEIJDEN P,MUNNIX I,AUGER J,GOVERS-RIEMSLAG J,COSEMANS J,KUIJPERS M,SPRONK H,WATSON S,RENNE' T,HEEMSKERK J.Dual role of collagen in factorXII-dependent thrombus formation.*Blood* 2009 Volume 114 Number 4.
81. MAAS C,GOVERS-RIEMSLAG JWP,BOUMA B,SCHIKS B,HAZENBERG BPC,LOKHORST HM,HAMMARSTRÖM P, TEN CATE H,DE GROOT PG,BOUMA BN,GEJBINK MFBG.Misfolded proteins activate Factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation.*Journal of Clinical Investigation* 2008 Volume 118 Issue 9 p 3208-3218.
82. BRYANT JW,SHARIAT-MADAR Z.Human plasma kallikrein-kinin system:Physiological and biochemical parameters.*Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2009 July;7(3): 234-250.

83. LAMMLE B,ZURAW BL,HEEB MJ,SCHWARZ HP,BERRETTINI M,CURD JG,GRIFFIN JH.Detection and quantitation of cleaved and uncleaved high molecular weight kininogen in plasma by ligand blotting with radiolabeled plasma prekallikrein or factor XI.*Thrombosis and Haemostasis* 1988 Vol 59 Issue 2 p151-161.
84. SUFFRITTI C,ZANICHELLI A,MAGGIONI L,BONANNI E,CUGNO M,CICARDI M.High-molecular-weight kininogen cleavage correlates with disease states in the bradykinin-mediated angioedema due to hereditary C1-inhibitor deficiency.*Clinical and Experimental Allergy* 2014 Volume 44 Issue 12 p1503-1514.
85. DEWALD G,BORK K,Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor.*Biochemical and Biophysical Research Communication* 2006 Vol 343, Issue 4 p1286-1289.
86. KAPLAN AP,GHEBREHIWET B.The plasma bradykinin- forming pathways and its relationships with complement.*Mol Immunol* 2010;47:2161- 2169.
87. COCHRANE CG,REVAK SD,WUEPPER KD.Activation of Hageman Factor in solid and fluid phases.*JEM* 1973 138 (6):1564.
88. SILVERBERG M,DIEHL SV.The activation of the contact system of human plasma by polysaccharide sulfates.*Ann N Y Acad Sci* 1987;516:268-79.
89. SAMUEL M,PIXLEY RA,VILLANUEVA MA,COLMANS RW,VILLANUEVA GB.Human factor XII(Hageman factor) autoactivation by dextran sulfate.*J Biol Chem* 1992;267:19691-7.
90. KUSUMAM J,THOLANIKUNNEL BG,BYGUM A,GHEBREHIWET B, KAPLAN AP.Factor XII-independent activation of the bradykinin-forming cascade: Implications for the pathogenesis of hereditary angioedema types I and II. *JACI* 2013 Volume 132 Issue 2 p 470-475.
91. SHARIAT-MADAR ZFA.Identification and Characterization of Prolylcarboxypeptidase as an Endothelial Cell Prekallikrein Activator.*Journal of Biological Chemistry* 2002 Vol. 277 No. 20 Issue 17 p. 17962-17969.
92. KAPLAN A,KUSUMAM J,SHIBAYAMA Y,NAKAZAWA Y,GHEBREHIWET B,REDDIGARI S,SILVERBERG M. Bradykinin Formation:Plasma and Tissue Pathways and Cellular Interactions.*Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 1998 Number 16 p 403-429.
93. HAN ED,MACFARLANE RC,MULLIGAN AN,SCAFIDI J,DAVIS AE.Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor.*J Clin Invest* 2002;109:1057-10635-7.
94. NUSSBERGER J,CUGNO M,CICARDI M,AGOSTONI A. Local bradykinin generation in hereditary angioedema.*J Allergy Clin Immunol* 1999;104:1321-2.
95. KAPLAN AP,JOSEPH K.The bradykinin forming cascade and its role in hereditary angioedema.*Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104:193-204.
96. LEEB-LUNDBERG LM.International union of pharmacology,XLV,Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences.*Pharmacol Rev* 2005 57, 27-77.
97. BOSSI F,FISCHETTI F,REGOLI D,DURIGUTTO P,FROSSI B,GOBEIL JRF,GHEBREHIWET B,PEERSCHKE E,CICARDI M,TEDESCO F.Novel pathogenic mechanism and therapeutic approaches to angioedema associated with C1 inhibitor deficiency.*Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009 Volume 124 Issue 6 p 303-1310.
98. CSUKA D,VARGA L,FARKAS H,FÜST G.Strong correlation of high EBNA-1-IgG levels with edematous attacks involving upper airway mucosa in hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency.*Molecular Immunology* 2012 Volume 49 Issue 4 p 649-654.
99. ENQUIST J,SKRÖDER C,WHISTLER JL, LEEB-LUNDBERG LMF.Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis.*Molecular Pharmacology* 2007 Volume 71 Issue 2 p 494-507.
100. BLAIS JR C,AURÈLE JM,SIMMONS W,LOUTE G,THIBAUT P,ASKIDGEL R,ADAM A.Des-Arg9-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P.*Peptides* 1999 Volume 20 Issue 4 p 421-430.
101. FERNANDO LP,NATESAN S,JOSEPH K,KAPLAN AP.High molecular weight kininogen and factor XII binding to endothelial cells and astrocytes.*Thromb Haemost* 2003;90:787-795.
102. JOSEPH K,GHEBREHIWET B,KAPLAN AP.Cytokeratin 1 and gC1qR mediate high molecular weight kininogen binding to endothelial cells.*Clin Immunol* 1999;92:246-255.
103. JOHNSON AM,ALPER CA,ROSEN FS,CRAIG JM.C1 inhibitor:evidence for decreased hepatic synthesis in hereditary angioneurotic edema.*Science* 1971 173:553.
104. ELLISON R,MASON S,KOHLER P,CURD J,RELLER P.Meningococcemia and acquired complement deficiency. Association in patients with hepatic failure.*Arch Intern Med* 1986 146:1539.
105. MURPHEY LJ,HACHEY DL,OATES JA, MORROW JD, BROWN NJ.Metabolism of bradykinin in vivo in humans: Identification of BK1-5 as a stable plasma peptide metabolite.*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000 Volume 294 Issue 1 p 263-269.

106. PRECHEL MM,ORAWSKI AT,MAGGIORA LL,SIMMONS WH.Effect of a new aminopeptidase P inhibitor, apstatin, on bradykinin degradation in the rat lung.*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995 Volume 275 Issue 3 p 1136-1142.
107. ZONNE L,ANURAG H,RELAN C,HACK E.Hereditary Angioedema Attacks: Local Swelling at Multiple Sites. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* February 2016 Volume 50 Issue 1 p 34-40.
108. MAGERL M,DOUMOULAKIS G,KALKOUNOU I,WELLER K,CHURCH MK,KREUZ W.Characterization of prodromal symptoms in a large population of patients with hereditary angio-oedema.*Clinical and Experimental Dermatology* 2014 Volume 39 Issue 3 p 298-303.
109. CYR M,LEPAGE Y,BLAIS C.Bradykinin and des- Arg(9)- bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma.*Am J Heart Circ Physiol* 2001;281:275-283.
110. VANHOOF G,MEESTER I,GOOSSENS F,HENDRIK D,SCHARPÉ S,YARON A.Kininase activity in human platelets: Cleavage of the Arg1-Pro2 bond of bradykinin by aminopeptidase P.*Biochemical Pharmacology* 1992 Volume 44 Issue 3 p 479-487.
111. MOLINARO G,CUGNO M,PEREZ M,LEPAGE Y,GERVAIS N,AGOSTONI A.Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of desarginine(9)-bradykinin.*J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303:232-7.
112. YANG HYT,ERDOS EG.Second kininase in human blood plasma.*Nature* 1967;215:1402-1403.
113. DACOSTA PLN,SIROIS P,TANNOCK IF,CHAMAS R.The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities.*Cancer Lett* 2014;345:27-3.
114. BLAIS C JR,COUTURE R,DRAPEAU G,COLMAN RW,ADAM A.Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan-induced arthritis in the Lewis rat.*Arthritis Rheum* 1997; 40:1327- 33.
115. YAYAMA K,WANG C,CHAO L,CHAO J.Kallikrein gene delivery attenuates hypertension and cardiac hypertrophy and enhances renal function in Goldblatt hypertensive rats.*Hypertension* 1998 31 p 1104-1110.
116. MANDLE RJR,KAPLAN AP.Hageman factor substrates.Human plasma prekallikrein:mechanism of activation by Hageman factor and participation in Hageman factor-dependent fibrinolysis.*J Biol Chem* 1977;252:6097-104.
117. BJORKQVIST J,JAMSA A,RENNE T.Plasma kallikrein:the bradykinin-producing enzyme.*Thromb Haemost* 2013;110:399-407.
118. YU H,ANDERSON PJ,FREEDMAN BI,RICH SS,BOWDEN DW.Genomic structure of the human plasma prekallikrein gene,identification of allelic variants,and analysis in end-stage renal disease.*Genomics* 2000;69:225-34.
119. FUJIKAWA K,CHUNG DW,HENDRICKSON LE,DAVIE EW.Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prekallikrein. *Biochemistry* 1986 May 6;25(9):2417-24.
120. MCMULLEN BA,FUJIKAWA K,DAVIE EW.Location of the disulfide bonds in human plasma prekallikrein: the presence of four novel apple domains in the amino-terminal portion of the molecule.*Biochemistry* 1991;30:2050-6.
121. HATHAWAY WE,BELHASEN LP,HATHAWAY HS.Evidence for a new plasma thromboplastin factor.Case report, coagulation studies and physicochemical properties.*Blood* 1965;26:521-32.
122. AZNAR JA,ESPANA F,AZNAR J,TASCON A.Fletcher factor deficiency:report of a new family.*Scand J Haematol* 1978;21:94-8.
123. ESSIEN EM,EBHOTA MI.Fletcher factor deficiency-detection of a severe case in a population survey.*Acta Haematol* 1977;58:353-8.
124. CURRIMBOHY Z,VINCIGUERRA V,PALAKAVONGS P,KUSLANSKY P,DECNAN TJ.Fletcher factor deficiency and myocardial infarction.*Am J Clin Pathol* 1976;65:970-4.
125. GIROLAMI A,VIDAL J,SALAGH M,GERVAN N,PARODY M,PERONI E.The old and the new in prekallikrein deficiency:historical context and a family from Argentina with PK deficiency due to a new mutation (Arg541Gln) in exon 14 associated with a common polymorphism (Asn124Ser) in exon 5.*Semin Thromb Hemost* 2014 40:592-9
126. LIN Y,SHENOY SS,HARRIS RB,COLMAN RW.Direct evidence for multifacial contacts between high molecular weight kininogen and plasma prekallikrein.*Biochemistry* 1996;35:12945-9.
127. RENNE' T,DEDDIO J,MEIJERS JCM,CHUNG D,MULLER-ESTERL W.Mapping of discontinuous h-kininogen binding site of plasma prekallikrein.*J Biol Chem* 1999;274:25777-84.
128. KATSUDA I,MARUYAMA F,EZAKI K,SAWAMURA T,ICHIHARA Y.A new type of plasma prekallikrein deficiency associated with homozygosity for Gly104Arg and Asn124Ser in apple domain 2 of the heavy-chain region.*Eur J Haematol* 2007;79(1):59-68.
129. MOTTA G,ROJKAER R,HASAN AAK,CINES DB,SCHMAIER AH.High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation.*Blood* 1998 91:516-28.
130. SEKI S,KAWAGUCHI Y,CHIBA K.A functional SNP in CLIP,encoding cartilage intermediate layer protein,is associated with susceptibility to lumbar disc disease.*Nat Genet* 2005;37:607-12.
131. SAITO H.Contact factors in health and disease.*Semin Thromb Hemost* 1987;13:36-49.

132. BISWAS N. Polymorphisms at the F12 and KLKB1 loci have significant trait association with activation of the renin-angiotensin system. *BMC Medical Genetics* 2016 17:21.
133. METTERS KM, ROSSIER J, PAQUIN J, CHRÉTIEN M, SEIDAH NG. Selective cleavage of proenkephalin-derived peptides (less than 23,300 daltons) by plasma kallikrein. *J Biol Chem* 1988;263(25):12543–53.
134. VERWEIJ N, MAHMUD H, MATEO LEACH I, DE BOER RA, BROUWERS FP, YU H. Genome-wide association study on plasma levels of midregional proadrenomedullin and C-terminal-pro-endothelin-1. *Hypertension* 2013;61(3):602–8.
135. KOHAN DE, ROSSI NF, INSCHO EW, POLLOCK DM. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. *Physiol Rev* 2011;91:1–77.
136. SAMSON WK. Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol* 1999;61:363–389.
137. VOGT S, WINKLER E, HERMSEN D, SCHOTT M, SCHINNER S, SCHERBAUM WA, WILLENBERG HS. Endothelin-1 and adrenomedullin plasma levels after exposure to fludrocortisone, dexamethasone, and spironolactone. *Clin Exp Hypertens* 2012;34:582–587.
138. INOUE A, YANAGISAWA M, TAKUWA Y, MITSUI Y, KOBAYASHI M, MASAKI T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 1989;264:14954–14959.
139. JAFFA MA, LUTTRELL D, SCHMAIER AH, KLEIN RL, LOPES-VIRELLA M, LUTTRELL LM. Plasma prekallikrein is associated with carotid intima-media thickness in type 1 diabetes. *Diabetes* 2016 65:498–502.
140. JAFFA AA, DURAZO-ARVIZU R, ZHENG D, LACKLAND DT, SRIKANTH S, GARVEY WT. A risk factor for hypertension and nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003 52:1215–21.
141. MUSANI SK, FOX ER, KRAJA A, BIDULESCU A, LIEB W, LIN H. Genome-wide association analysis of plasma B-type natriuretic peptide in Blacks. The Jackson Heart Study. *Circ Cardiovasc Genet* 2015 8:122–30.
142. BIRD JE, SMITH PL, WANG X, SCHUMACHER WA, BARBERA F, REVELLI JP. Effects of plasma kallikrein deficiency on haemostasis and thrombosis in mice: murine ortholog of the Fletcher trait. *Thromb Haemost* 2012 107:1141–50.
143. STAVROU EX, FANG C, MERKULOVA A, ALHALABI O, GROBE N, ANTONIAK S. Reduced thrombosis in KLKB1^{-/-} mice is mediated by increased Mas receptor, prostacyclin, Sirt1 and KLF4 and decreased tissue factor. *Blood* 2015 125:710–9.
144. ROCHE O, BLANCH A, CABALLERO T, SASTRE N, CALLEJO D, LÓPEZ TRASCASA M. Hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency: patient registry and approach to the prevalence in Spain. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005 94:498–503.
145. SPELETAS M, SZILAGYI A, PSARROS F, MOLDOVAN D, MAGERL M, KOMPOTI M, GRAMOUSTIANOU E, BORS A, MIHALY E, TORDAI A, AVRAMOULI A, VARGA L, MAURER M, FARKAS H, GERMENIS AE. Hereditary angioedema: molecular and clinical differences among European populations. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:570–573.
146. DUPONCHEL C, DJENOUGHAT K, FRÉMEAUX-BACCHI V, MONNIER N, DROUET C, TOSI M. Functional analysis of splicing mutations and of an exon2 polymorphic variant of SERPING1/C1NH. *Hum Mutat* 2006 27:295–296.
147. DUAN QL, NIKPOOR B, DUBE MP, MOLINARO G, MEIJER IA, DION P, ROCHEFORT D. A variant in XPNPEP2 is associated with angioedema induced by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Am J Hum Genet* 2005 77:617–26.
148. PARE G, KUBO M, BYRD JB, MCCARTY CA, WOODARD-GRICE A, TEO KK, ANAND SS. Genetic variants associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Pharmacogenet Genomics* 2013 23:470–478.
149. FREIBERGER T, GROMBIŘÍKOVÁ H, RAVČUKOVÁ B, JARKOVSKÝ J, KUKLÍNEK P, KRYŠTŮFKOVÁ O, HANZLÍKOVÁ J. No evidence for linkage between the hereditary angioedema clinical phenotype and the BDKR1, BDKR2, ACE or MBL2 gene. *Scand J Immunol* 2011 74:100–106.
150. KANAJI T, OKAMURA T, OSAKI K, KUROIWA M, SHIMODA K, HAMASAKI N. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 50-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood* 1998; 91:2010–2014.
151. BORS A, CSUKA D, VARGA L, FARKAS H, TORDAI A, FÜST G, SZILAGYI A. Less severe clinical manifestations in patients with hereditary angioedema with missense C1INH gene mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1708–1711.
152. LAMMLE B, WUILLEMIN W, HUBER I, KRAUSKOPF M, ZURCHER C. Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency: a study of 74 subjects from 14 Swiss families. *Thromb Haemost* 1991;65:117–121.
153. SPELETAS M, SZILAGYI A, CSUKA D, KOUTSOSTATHIS N, PSARROS F, MOLDOVAN D, MAGERL M, KOMPOTI M, VARGA L, MAURER M, FARKAS H, GERMENIS AE. F12-46C/T polymorphism as modifier of the clinical phenotype of hereditary angioedema. *Allergy* 2015 70 p 1661–1664.
154. CHARIGNON D, GHANNAM A, DEFENDI F, PONARD D, MONNIER N, LOPEZ TRASCASA M, LAUNAY D, CABALLERO T, DJENOUGHAT K, FAIN O, CICHON S, MARTIN L, DROUET C. Hereditary angioedema with F12 mutation: factors modifying the clinical phenotype. *Allergy* 2014;69:1659–1665.

155. DÉCARIE A, RAYMOND P, GERVAIS N, COUTURE R, ADAM A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996; 271:H1340–7.
156. ADAM A, CUGNO M, MOLINARO G, PEREZ M, LEPAGE Y, AGOSTONI A. Amino peptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet* 2002; 359:2088–9.
157. DUAN QL, NIKPOOR B, DUBÉ M-P, MOLINARO G, MEIJER IA, DION P. A variant in XPNPEP2 is associated with angioedema induced by angiotensin converting enzyme inhibitors. *Am J Hum Genet* 2005; 77:617–26.
158. ZAMANAKOU M, LOULES G, CSUKA D, BOVA M, PSARROS F, PARSOPOULOU F, SPELETAS M, FIRINU D, PASQUALE T, ZOLI A, RADICE A, PIZZIMENTI S, ZANICHELLI A, MANOUSSAKIS E, KONSTANTINOOU GN, FARKAS H, CICARDI M, GERMENIS AE. Genotyping unknown hereditary angioedema (U-HAE) and idiopathic non-histaminergic acquired angioedema (Inh-AAE): preliminary evidence of pathogenic variants. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2017; 13(Suppl 2):29, abstract nr.O-20.
159. SEELEY JE, ATLAS SA, LARAGH JH, SILVERBERG, KAPLAN AP. Initiation of plasma prorenin activation by Hageman factor-dependent conversion of plasma prekallikrein. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76:5914–5918.
160. GITTLEMAN HR, MERKULOVA A, ALHALABI O, STAVROU EX, VEIGL ML, BARNHOLTZ-SLOAN JS, SCHMAIER AH. A cross-sectional study of KLKB1 and PRCP polymorphisms in patient samples with cardiovascular disease. *Front Med* 2016; 3:17.
161. DEROUX A, DUMESTRE-PERARD C, KHALIL-MGHARBEL A, MAIGNAN M, BOCCON-GIBOD I, FEVRE MC, VILGRAIN I, BOUILLET L: BIOBRAD Study: The search for biomarkers of bradykinin-mediated angio-oedema attacks. *Int Arch Allergy Immunol* 2016; 170:108–114.

Genetic Determinants of C1 Inhibitor Deficiency Angioedema Age of Onset

Panagiota Gianni^a Gedeon Loules^b Maria Zamanakou^b Maria Kompoti^a
Dorottya Csuka^d Fotis Psarros^c Markus Magerl^e Dimitru Moldovan^f
Marcus Maurer^e Matthaios G. Speletas^a Henriette Farkas^d
Anastasios E. Germenis^a

^aDepartment of Immunology and Histocompatibility, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, and ^bCeMIA SA, Larissa, and ^cDepartment of Allergy, Navy Hospital, Athens, Greece;
^dHungarian Angioedema Center, 3rd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary; ^eDepartment of Dermatology and Allergy, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany;
^fUniversity of Medicine and Pharmacy, Tirgu Mures, Romania

Keywords

Age of disease onset · C1 inhibitor deficiency · F12-46C/T polymorphism · Hereditary angioedema · KLKB1-S143N polymorphism

Abstract

Background: In view of the large heterogeneity in the clinical presentation of hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency (C1-INH-HAE), great efforts are being made towards detecting measurable biological determinants of disease severity that can help to improve the management of the disease. Considering the central role that plasma kallikrein plays in bradykinin production, we investigated the contribution of the functional polymorphism KLKB1-428G/A to the disease phenotype. **Methods:** We studied 249 C1-INH-HAE patients from 114 European families, and we explored possible associations of C1-INH-HAE clinical features with carriage of KLKB1-428G/A, combined or not with that of the functional F12-46C/T polymorphism. **Results:** Carriers of the G allele of the KLKB1-428G/A polymorphism exhibited a significantly delayed disease onset (i.e., by 4.1 years [$p < 0.001$], depending on the zygosity status), while carriers of both the

KLKB1-428G/A and the F12-46C/T polymorphism displayed an 8.8-year delay in disease onset ($p < 0.001$) and a 64% lower probability of needing long-term prophylactic treatment ($p = 0.019$). **Conclusions:** These findings support our initial hypothesis that functional alterations in genes of proteins involved in bradykinin metabolism and function affect the clinical phenotype and possibly contribute to the pathogenesis of C1-INH-HAE. Given that an earlier onset of symptoms is inversely correlated with the subsequent course of the disease and, eventually, the need for long-term prophylaxis, these polymorphisms may be helpful prognostic biomarkers of disease severity.

© 2017 S. Karger AG, Basel

Introduction

Hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency (C1-INH-HAE) is a rare autosomal dominant disorder that manifests with recurrent incapacitating attacks of edema localized in subcutaneous or mucosal tissues, spontaneously developing in any body compartment. In C1-INH-HAE patients, numerous *SERPINE1* variants

© S. Karger AG, Basel
PROOF Copy
for personal
use only

ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.