



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ - ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ



Διευθυντής: Καθ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
«Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής»

**Ο ρόλος των πολυμορφισμών *FXII-T46C* (rs1801020)  
και *BDKRB1-(-699G>C)* (rs4905475) στο φαινότυπο  
ασθενών με κληρονομικό αγγειοίδημα**

Κουβάτα Ευαγγελία

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σπελέτας Ματθαίος

Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας

Λάρισα 2013

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Ματθαίος Σπελέτας**

*Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας  
(επιβλέπων)*

**Αναστάσιος Γερμενής**

*Καθηγητής Ανοσολογίας*

**Γεώργιος Χατζηγεωργίου**

*Καθηγητής Νευρολογίας*

## Ευχαριστίες

Η διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ολοκληρώνοντας τη μεταπτυχιακή μου διατριβή, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ματθαίο Σπελέτα για τη βοήθεια, τη στήριξη και την καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα. Με πολύ εκτίμηση, θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας κ. Αναστάσιο Ε. Γερμενή και διευθυντή του Εργαστηρίου, που με δέχτηκε ως μέλος του εργαστηρίου και μου πρόσφερε τα υλικά μέσα για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Ως μέλος της τριμελούς επιτροπής, θα ήθελε να ευχαριστήσω για την συμμετοχή του και τον Καθηγητή Νευρολογίας κ. Γεώργιο Χατζηγεωργίου.

Ανεκτίμητη υπήρξε η βοήθεια που μου προσέφεραν όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστώ τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες Ευαγγελία Γραμουτσιάνου και Μαρία Ζαμανάκου, τις διδακτορικές φοιτητές Νικολέτα Αργέντου και Αντιγόνη Μαμάρα για τις πολύτιμες συμβουλές τους και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Κατερίνα Καμνηιώτη και Ειρήνη Σεβδαλή, καθώς ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής δουλειάς μου. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Ευαγγελία Καραμούτη, τεχνολόγο του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθεια της, την Φανή Τσαντούλα, όπως επίσης και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την ευχάριστη ατμόσφαιρα καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ψυχολογική και υλική υποστήριξη που προσφέρουν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

<b>A. Γενικό Μέρος</b> .....	7
A1. Εισαγωγή.....	7
A2. Αγγειοίδημα.....	8
A3. Κλινική εικόνα του ΚΑΟ.....	11
A4. Διάγνωση του ΚΑΟ.....	13
A5. Μοριακή παθογένεια ΚΑΟ.....	14
A6. Παράγοντας Hageman.....	17
A6.1. Ιστορικό υπόβαθρο.....	17
A6.2. Χαρτογράφηση του FXII .....	17
A6.3. Δομή του FXII.....	18
A6.4. Φυσιολογικός ρόλος του FXII.....	22
A6.5. Ο πολυμορφισμός T46C του γονιδίου του <i>FXII</i> .....	23
A7. Υποδοχείς BK.....	25
A7.1. Ιστορικό υπόβαθρο.....	25
A7.2. Το σύστημα ταξινόμησης των BK υποδοχέων.....	25
A7.3. Γενικές πληροφορίες.....	26
A7.4. Φυσιολογία των B1 υποδοχέων.....	27
A7.5. Ο πολυμορφισμός -699G>C του γονιδίου του <i>BDKRB1</i> .....	29
A8. Ερευνητική υπόθεση.....	30
A9. Σκοπός.....	31
<b>B. Ειδικό Μέρος- Υλικό και Μεθοδολογία</b> .....	33
B1. Υλικό.....	33

B1.1. Βιολογικό Υλικό.....	33
B1.2. Εργαστηριακός Εξοπλισμός.....	35
B1.3. Αναλώσιμα Αντιδραστήρια.....	36
B2. Μεθοδολογία και Γενικές Αρχές.....	37
B2.1. Απομόνωση Γενωμικού DNA.....	37
B2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	39
B2.3. Πέψη με Ένζυμα Περιορισμού.....	42
B2.4. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης.....	44
B2.5. Καθαρισμός των προϊόντων PCR προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.....	45
<b>Γ. Αποτελέσματα.....</b>	<b>47</b>
G1. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης των προϊόντων πέψης.....	47
G2. Αλληλούχιση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	48
G3. Στατιστική ανάλυση.....	49
G3.1. Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό <i>FXII-C46T</i> .....	49
G3.2. Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό <i>BDKRB1</i> -(- 699G>C).....	52
<b>Δ. Συζήτηση.....</b>	<b>55</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>59</b>

## Συντομογραφίες

<b>ACE</b>	Αναστολέας του μετατρεπτικού ενζύμου ή κινινάση II
<b>Activated partial thomboplastintime, aPTT</b>	Ενεργοποιημένος χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης
<b>B1 receptor, B1R</b>	Υποδοχέας B1
<b>B2receptor, B2R</b>	Υποδοχέας B2
<b>BK</b>	BK
<b>C1 inhibitor, C1-INH</b>	Αναστολέας της C1 εστεράσης
<b>Cytokeratin 1, CK1</b>	Κυτταροκερατίνη 1
<b>High Molecular WeightKininogen, HWMK, HK</b>	Υψηλούμοριακού βάρους κινινογόνο
<b>Factor XII, FXII, Factor Hageman</b>	Παράγοντας XII
<b>Factor XII fragment, XIIf</b>	Τμήμα του παράγοντα XII
<b>Inflammatory Bowel Disease, IBD</b>	Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου
<b>Low molecular weight kininogen, LMWK</b>	Χαμηλού μοριακού βάρους κινινογόνο
<b>Plasmakallikrein, PK</b>	Καλλικρεΐνη πλάσματος
<b>Prekallikrein, Fletcherfactor, PPK</b>	Προκαλλικρεΐνη
<b>PolyLcarboxypeptidase, PRC</b>	Πολυλκαρβοξυπεπτιδάση
<b>Receptor of the globular head of C1q, bC1qR</b>	Υποδοχέας της σφαιρικής κεφαλής του μορίου C1q
<b>Tissue Kallikrein, TK</b>	Ιστική καλλικρεΐνη
<b>Tissue Factor, TF</b>	Ιστικός παράγοντας
<b>Tissue Plasminogen Activator, tPA</b>	Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου
<b>Urokinase Plasminogen Activator, uPA</b>	Ενεργοποιητής της ουροκινάσης του πλασμινογόνου
<b>Urokinase plasminogen activator receptor, u-PAR</b>	Υποδοχέας του ενεργοποιητή της ουροκινάσης πλασμινογόνου
<b>KAO</b>	Κληρονομικό Αγγειοίδημα
<b>EAO</b>	Επίκτητο Αγγειοίδημα

## A. Γενικό Μέρος

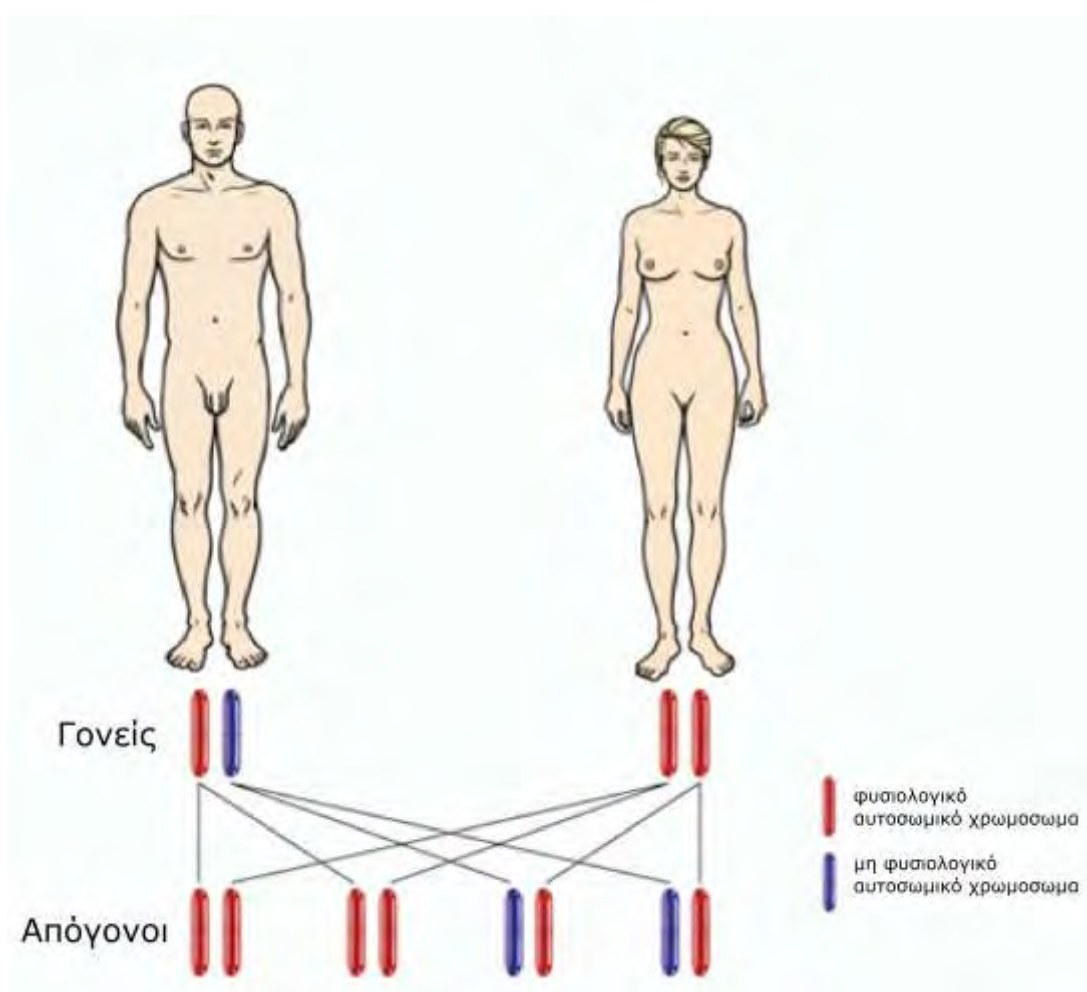
### A1. Εισαγωγή

Το ΚΑΟ είναι μια γενετική πάθηση, που κληρονομείται με σωματικό επικρατούντα τρόπο. Χαρακτηρίζεται από επεισόδια εμφάνισης τοπικού οιδήματος στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος, στον εντερικό ή στον αναπνευστικό βλεννογόνο και είναι αυτοπεριοριζόμενο.<sup>1</sup> Η νόσος μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση της ποιότητας ζωής, ακόμα και στο θάνατο. Η παθογένεση της ασθένειας οφείλεται ή σε έλλειψη ή σε μετάλλαξη μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται C1-INH. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα είτε τη χαμηλή ποσότητα της πρωτεΐνης στο πλάσμα (τύπου I) είτε τη μειωμένη λειτουργικότητα της (τύπου II). Και στις δυο περιπτώσεις εμφανίζονται τα ίδια συμπτώματα.<sup>2</sup> Ο C1-INH είναι ο κύριος ρυθμιστής του FXII και του συστήματος επαφής. Έτσι, η ανεπάρκεια του C1-INH έχει ως αποτέλεσμα την υπερβολική ενεργοποίηση του συστήματος επαφής και κατά συνέπεια την αυξημένη παραγωγή BK.<sup>3</sup> Οι κρίσεις οιδήματος οφείλονται στην παθολογική συγκέντρωση της BK. Η BK προσδέεται στον υποδοχέα B2 στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και επάγει αγγειοδιαστολή και αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα.<sup>4</sup>

Ακόμη και αν η γενετική βάση του ΚΑΟ έχει περιγραφεί και έχουν προσδιοριστεί σχεδόν 200 μεταλλάξεις μέχρι σήμερα στο γονίδιο του C1-INH (*SERPING1*) (<http://hae.enzim.hu>), η παθογένεση του οιδήματος δεν έχει ακόμη πλήρως κατανοηθεί.<sup>5,6</sup> Η συχνότητα των επεισοδίων δεν συσχετίζεται ούτε με την ηλικία έναρξης, ούτε με την εντόπιση ή τη σοβαρότητά τους και είναι ιδιαίτερα μεταβλητή ακόμη και μεταξύ των μελών μιας οικογένειας που φέρει την ίδια μετάλλαξη.<sup>7,8,9</sup> Το είδος και η θέση της μετάλλαξης μπορούν να παρέχουν μόνο ενδείξεις για το αν το ΚΑΟ είναι τύπου I ή II, αλλά δεν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κλινική πορεία της νόσου. Εξάιρεση αποτελεί ένα πρόσφατο άρθρο που συνδέει τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις με ηπιότερη μορφή της ασθένειας.<sup>10</sup> Για αυτό, είναι πιθανό ότι και άλλοι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες εκτός του γονιδίου του C1-INH έχουν κάποια επίδραση στην εκδήλωση της νόσου.

## A2. Αγγειοοίδημα

Το αγγειοοίδημα είναι η ταχεία διόγκωση (οίδημα) του δέρματος, του υποδόριου ιστού, του βλεννογόνου και του υποβλεννογόνου ιστού.<sup>6</sup> Ταξινομείται είτε ως κληρονομικό είτε ως επίκτητο. Το ΕΑΟ συνήθως προκαλείται από αλλεργία και εμφανίζεται μαζί με άλλα αλλεργικά συμπτώματα και κνίδωση.<sup>11</sup> Μπορεί επίσης να εμφανιστεί ως παρενέργεια σε ορισμένα φάρμακα, ιδιαίτερα στους αναστολείς του ACE.<sup>11</sup> Το ΚΑΟ προκαλείται από γενετική μετάλλαξη που κληρονομείται με σωματικό επικρατούντα τρόπο (εικόνα 1).<sup>12</sup> Η συχνότητα του είναι χαμηλή, μεταξύ 1:10.000 έως 1:50.000. Το ΚΑΟ χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια του C1-INH που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συστήματος επαφής με συνέπεια την απελευθέρωση βραδυκινίνης, η οποία αποτελεί τον κύριο μεσολαβητή των κρίσεων.<sup>13,14</sup>



Εικόνα 1. Τρόπος κληρονομίας του ΚΑΟ<sup>15</sup>

Υπάρχουν τρεις μορφές ΚΑΟ:



- Το ΚΑΟ τύπου I, το οποίο αντιπροσωπεύει το 80% έως 85% όλων των περιπτώσεων, χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη σύνθεση του C1-INH, τα αντιγονικά και τα λειτουργικά επίπεδα του οποίου στον ορό των ασθενών είναι ελαττωμένα.<sup>16</sup> Επιπλέον, τα επίπεδα του παράγοντα C4 του συμπληρώματος παρουσιάζονται ελαττωμένα στον ορό και αυτό αποτελεί διαγνωστικό δείκτη.<sup>17</sup> Οι μεταλλάξεις στο ΚΑΟ τύπου I εκτείνονται σε όλο το γονίδιο του C1-INH οδηγώντας στην παραγωγή μη φυσιολογικής πρωτεΐνης που δεν εκκρίνεται.<sup>18</sup>
- Στο ΚΑΟ τύπου II (15 με 20% όλων των περιπτώσεων) οι μεταλλάξεις οδηγούν σε αντικαταστάσεις ενός αμινοξέος, κυρίως στο εξώνιο 8 (στο ενεργό κέντρο του ενζύμου) και παρατηρούνται σχετικά φυσιολογικά, ή ακόμα και αυξημένα, επίπεδα κυκλοφορίας του C1-INH.<sup>7</sup> Παρόλα αυτά σε αυτή την περίπτωση η πρωτεΐνη που εκκρίνεται δεν είναι λειτουργική, με αποτέλεσμα μειωμένα λειτουργικά επίπεδα C1-INH στο πλάσμα με φυσιολογικά ή αυξημένα αντιγονικά επίπεδα.<sup>18</sup> Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι αυθόρμητες απαμίνωσεις των μεθυλιωμένων κυτοσίνων των νησίδων CrG.<sup>19</sup> Επιπλέον, τα επίπεδα του C4 παράγοντα του συμπληρώματος μειώνονται.<sup>20</sup>

Ενδιαφέρον προκαλεί ότι στο ΚΑΟ τύπου I και II, υπάρχει ένα φυσιολογικό γονίδιο επομένως η σύνθεση του C1-INH θα πρέπει θεωρητικά να είναι στο 50% της κανονικής. Ωστόσο, στο τύπου I, η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών του C1-INH είναι συχνά πολύ μικρότερη (30% ή λιγότερο), και στη νόσο τύπου II φυσιολογικές πρωτεΐνες του C1-INH λιγότερες από τις δυσλειτουργικές πρωτεΐνες. Περαιτέρω μείωση του φυσιολογικού γονιδιακού προϊόντος μπορεί να συμβεί λόγω του αυξημένου καταβολισμού του φυσιολογικού αντιγράφου λόγω της ενεργοποίησης κάποιων πρωτεασών,<sup>21</sup> ή λόγω καταστολής του mRNA της φυσιολογικής πρωτεΐνης.<sup>22,3</sup>

- Το ΚΑΟ τύπου III, οφείλεται σε ορισμένες περιπτώσεις σε μεταλλάξεις του γονιδίου *FXII*, αν και μόνο τρεις από αυτές έχουν ταυτοποιηθεί. Στις υπόλοιπες παραμένει άγνωστη η αιτιολογία του. Η μία μετάλλαξη οδηγεί σε αντικατάσταση της θρεονίνης με αργινίνη (Thr309Arg), η άλλη σε αντικατάσταση θρεονίνης με λυσίνη (Thr309Lys), όπως και η τρίτη αλλά σε άλλη θέση (Thr328Lys).<sup>23</sup> Πιο συγκεκριμένα, οι υποκαταστάσεις αμινοξέων που περιγράφηκαν, βρίσκονται στην πλούσια σε προλίνη περιοχή του FXII. Αυτή η περιοχή, φαίνεται ότι παίζει κάποιο ρόλο στην πρόσδεση του FXII σε αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες (μέσω των οποίων ενεργοποιείται). Προτείνεται ότι οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να επηρεάζουν τους

μηχανισμούς της ενεργοποίησης του FXII με επαφή, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η μη φυσιολογική ενεργοποίησή του.<sup>24</sup> Ο τύπος αυτός φαίνεται ότι επηρεάζεται από το ορμονικό σύστημα, καθώς έχει παρατηρηθεί η εκδήλωσή του σε γυναίκες κατά την περίοδο της κύησης ή μετά από θεραπεία με οιστρογόνα. Επιπλέον, τα επίπεδα του C4 παράγοντα δεν μεταβάλλονται.<sup>25</sup>

Επίσης, το ΚΑΟ άγνωστης αιτιολογίας παρουσιάζει φυσιολογικά επίπεδα λειτουργικότητας του C1-INH ενώ δεν παρατηρείται μετάλλαξη στο γονίδιο του FXII.<sup>26,27</sup>

Το ΕΑΟ είναι μία ακόμη μορφή αγγειοδήματος που χαρακτηρίζεται από επίκτητη ανεπάρκεια του C1-INH, υπερβολική ενεργοποίηση της κλασσικής οδού του συμπληρώματος και επαναλαμβανόμενες κρίσεις οιδήματος<sup>28,29</sup> Το ΕΑΟ διακρίνεται επίσης σε 2 τύπους.

- Ο τύπος I χαρακτηρίζεται από ελαττωμένα επίπεδα τόσο της συγκέντρωσης, όσο και της δραστηριότητας του C1-INH και παρατηρείται κατά τη διάρκεια της πορείας νόσων των Β λεμφοκυττάρων (χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και πολλαπλόν μυέλωμα).<sup>28</sup>
- Ο τύπος II χαρακτηρίζεται από ελάττωση της δραστηριότητας του ενζύμου λόγω της επίδρασης αυτοαντισωμάτων.<sup>30</sup> Επίσης ως ΕΑΟ χαρακτηρίζονται διάφοροι τύποι δευτερευόντων ανεπαρκειών του C1-INH, όπως το αγγειοίδημα που προκαλείται από χορήγηση συγκεκριμένων φαρμάκων κατά της υπέρτασης (ACE-i, ανταγωνιστές AT2R)<sup>31,32</sup> και το ιδιοπαθές αγγειοίδημα.<sup>33</sup>

Πίνακας 1. Τύποι αγγειοιδήματος.

<b>Κληρονομικό αγγειοίδημα</b>	
<b>Τύπου I</b>	Μεταλλάξεις του <i>SERPING1</i> , χαμηλά αντιγονικά και λειτουργικά επίπεδα C1-INH
<b>Τύπου II</b>	Μεταλλάξεις του <i>SERPING1</i> , φυσιολογικά αντιγονικά, αλλά χαμηλά λειτουργικά επίπεδα C1-INH
<b>Τύπου III</b>	Μεταλλάξεις FXII, οιστρογονοεξαρτώμενο
<b>Επίκτητο αγγειοίδημα</b>	
<b>Τύπου I</b>	Ανεπάρκεια C1-INH, παρανεοπλασματικό, αυξημένος καταβολισμός του C1-INH
<b>Τύπου II</b>	Ανεπάρκεια C1-INH, σχετιζόμενο με αυτοάνοσες διαταραχές, αυτοαντισώματα έναντι του C1-INH
<b>ΚΑΟ άγνωστης αιτιολογίας</b>	Χωρίς γνωστή γενετική αιτία, φυσιολογικός C1-INH
<b>Επαγόμενο από ACEi</b>	
<b>Επαγόμενο από άλλα φάρμακα</b>	

### A3. Κλινική εικόνα του ΚΑΟ

Η κλινική βαρύτητα της νόσου δεν έχει συσχετιστεί με το είδος της μετάλλαξης,<sup>34,5</sup> ενώ μπορεί να μεταβάλλεται στον ίδιο τον ασθενή, ανάλογα με την ηλικία του. Χαρακτηρίζεται από αυτομάτως υφιέμενα επεισόδια οιδημάτων των υποδόριων ιστών και των βλεννογόνων του εντέρου και των ανώτερων αναπνευστικών οδών.<sup>35</sup> Η εκδήλωση των συμπτωμάτων διαφέρει μεταξύ των πασχόντων, τόσο ως προς το συνδυασμό των συμπτωμάτων όσο και ως προς την έντασή τους (εικόνα 2).<sup>36,37</sup> Το εύρος της συχνότητας των επεισοδίων μπορεί να ξεκινά από ασυμπτωματική εικόνα (σπάνιες περιπτώσεις), ως και συχνά εβδομαδιαία επεισόδια<sup>38</sup>

Το οίδημα του λάρυγγα αποτελεί το σοβαρότερο σύμπτωμα του αγγειοοιδήματος από ανεπάρκεια C1-INH. Συνήθως εισβάλλει βαθμιαία με αλλοίωση της φωνής και δυσφαγία, ενώ καταλήγει σε πλήρη απόφραξη της αναπνευστικής οδού. Το οίδημα του λάρυγγα παρατηρείται στο 50% των ασθενών και μπορεί να προκαλέσει οξεία απόφραξη του ανώτερου αναπνευστικού. Οι θάνατοι στο ΚΑΟ προκαλούνται κυρίως από αυτή την επιπλοκή.<sup>39</sup> Πιο συγκεκριμένα, ευθύνεται για το 20-50% των θανάτων που έχουν συμβεί σε αδιάγνωστες περιπτώσεις, ενώ στο 2-16% των ασθενών επιβάλλεται διενέργεια τραχειοτομής.<sup>15</sup> Οι ασθενείς συχνά αναφέρουν οίδημα λάρυγγα ταχέως εξελισσόμενο ακόμα και μέσα σε χρονικό διάστημα 20'.<sup>39</sup> Η ενδεχόμενη εμφάνιση οιδήματος του λάρυγγα σε ασυμπτωματικά μέλη της οικογένειας των πασχόντων, συνήθως κατά την διάρκεια ή μετά από επεμβάσεις στην περιοχή του στόματος, επιβάλλει τον προληπτικό έλεγχο για αποκάλυψη και ενημέρωση των συγγενών που παρουσιάζουν την ανεπάρκεια.<sup>39</sup>

Η προσβολή του γαστρεντερικού σωλήνα είναι η πιο συχνή (70 με 80% των ασθενών).<sup>40</sup> Χαρακτηρίζεται από οξύ κωλικοειδές άλγος, ναυτία, έμετο, σπανιότερα διάρροια ή παροδικό ειλεό. Ο έμετος μπορεί να είναι τόσο έντονος, ώστε λόγω και της συνυπάρχουσας αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, να προκαλέσει μεγάλη απώλεια υγρών από των αγγειακό χώρο και σημαντικού βαθμού λευκοκυττάρωση. Τα συμπτώματα αυτά συνοδεύονται από διάταση της κοιλίας σε μεγάλο βαθμό. Ενδέχεται επίσης να εμφανιστεί χαμηλή πυρετική κίνηση.<sup>9</sup>

Το υποδόριο οίδημα είναι σκληρό, περιγεγραμμένο, δεν συνοδεύεται από πόνο και διαρκεί 2-5 ημέρες. Μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε σημείο του σώματος, αλλά συνηθέστερα εντοπίζεται στα άκρα. Στην πλήρη έκφραση του υποδόριου οιδήματος δεν καταλείπεται εντύπωμα κατά την πίεση, τα βλέφαρα δεν μπορούν να ανοίξουν και τα

δάκτυλα είναι αδύνατο να πλησιάσουν μεταξύ τους (εικόνα 2). Της εμφανίσεως του οιδήματος προηγείται συνήθως αίσθημα τάσεως των υποδόριων ιστών ή ερπητόμορφη διάσφιξη του δέρματος στις αντίστοιχες περιοχές.<sup>41,42</sup>

Κρίσεις αγγειοοιδήματος μπορεί να εκλυθούν από τραύμα, οδοντιατρικές και χειρουργικές επεμβάσεις, ψυχικό στρες, λοιμώξεις, φάρμακα (όπως ΑΜΕΑ, αντιουλληπτικά), άλλοτε πάλι δεν ανιχνεύονται προφανή αίτια. Πριν την εμφάνιση των κρίσεων μπορεί να προηγηθούν συμπτώματα όπως κνησμός, ναυτία, διάρροιες, ερύθημα.<sup>43</sup>

Μία κρίση αγγειοοιδήματος συνήθως ξεκινά ως προοδευτική διόγκωση μέσα στις πρώτες 24 ώρες, ακολουθούμενη από μόνιμο οίδημα για τις επόμενες 2-5 ημέρες, πριν υποχωρήσει τελείως.<sup>43,1</sup> Για άγνωστους λόγους, μετά από ένα επεισόδιο αγγειοοιδήματος δεν παρατηρείται άμεσα νέο, γεγονός.<sup>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</sup>

Η ηλικία εμφάνισης του ΚΑΟ ποικίλει ευρύτατα. Συνήθως εμφανίζεται για πρώτη φορά κατά την παιδική ηλικία (μέση ηλικία εμφάνισης 8-12 έτη),<sup>42</sup> με ήπια συμπτώματα, χωρίς όμως να αποκλείονται και τα σοβαρά επεισόδια. Η ηλικία έναρξης σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου, μιας και όσο μικρότερη η ηλικία τόσο βαρύτερη κατά κανόνα η πρόγνωση.<sup>35</sup> Επομένως η ηλικία έναρξης είναι ο σημαντικότερος γνωστός προγνωστικός δείκτης της νόσου.



Εικόνα 2. Χαρακτηριστικές εικόνες ασθενών κατά τη διάρκεια κρίσεων του ΚΑΟ. Περιπτώσεις οιδήματος στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πρόσωπο. (από <http://www.haea.org/> με τροποποιήσεις).

#### A4. Διάγνωση του ΚΑΟ

Η διάγνωση του ΚΑΟ στηρίζεται στην κλινική εικόνα, το οικογενειακό ιστορικό του ασθενούς και κυρίως στη μελέτη του συμπληρώματος.<sup>44,45,46</sup> Αν υπάρχει κλινική υποψία για τη νόσο, συνίσταται η μέτρηση των επιπέδων της C4, (η C4 είναι φυσιολογική στα μεσοδιαστήματα των κρίσεων μόνο στο 2% των περιπτώσεων,<sup>47,48</sup>) της C1 και του C1-INH. Η C1 (η πιο σημαντική πρωτεΐνη του συμπληρώματος όσον αφορά το ΚΑΟ) είναι ένα σύμπλοκο των συστατικών C1q, C1r, και C1s. Η C1 είναι ασταθής όταν απουσιάζει ο C1-INH έτσι ώστε η C1r αυτοενεργοποιείται οδηγώντας στην ενεργοποίηση του C1s το οποίο με τη σειρά του διασπάται και ενεργοποιεί την C4. Το γεγονός αυτό εξηγεί τα χαμηλά επίπεδα της C4 στο 95% των ασθενών με ΚΑΟ ακόμα και όταν είναι ασυμπτωματικοί. Εάν τα επίπεδα της C4 και του C1-INH στον ορό είναι χαμηλά (κάτω από το φυσιολογικό εύρος του παρασκευαστή) και δεν υπάρχει υπόνοια ΕΑΟ, τότε η διάγνωση είναι ΚΑΟ τύπου I. Αν υπάρχει πιθανότητα ΕΑΟ τότε ελέγχονται τα επίπεδα της C1q. Αν τα επίπεδα της C1q είναι

χαμηλά, η διάγνωση είναι ΑΑΕ.<sup>49</sup> Αν η λειτουργικότητα της C1-INH είναι χαμηλή, με φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα της C1-INH αντιγονικής πρωτεΐνης και φυσιολογικό C1q, η διάγνωση είναι ΚΑΟ τύπου II. Αν τα επίπεδα της C4 και του C1-INH είναι φυσιολογικά αποκλείονται το ΚΑΟ τύπου I και II, αλλά πιθανόν είναι τύπου III. Στο ΚΑΟ τύπου III συνήθως ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο γονίδιο του *FXII*.<sup>50</sup> Ο γενετικός έλεγχος είναι απαραίτητος για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση του ΚΑΟ.<sup>51,48</sup>

Πίνακας 2. Εργαστηριακή διάγνωση αγγειοιδήματος.

	ΚΑΟ τύπου I	ΚΑΟ τύπου II	ΚΑΟ τύπου III	ΕΑΟ
Αντιγονικά επίπεδα C1-INH	↓	Φ	Φ	↓
Λειτουργικά επίπεδα C1-INH	↓	↓	Φ	Φ ή ↓
C3	Φ	Φ	Φ	Φ
C4	↓	↓	Φ	↓
C1q	Φ	Φ	Φ	↓

## A5. Μοριακή παθογένεια ΚΑΟ

Μέχρι σήμερα, σε ασθενείς με ΚΑΟ τύπου I και II έχουν ανιχνευθεί πάνω από 200 μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1*.<sup>52,1</sup> Στο 15-25% των περιπτώσεων οι μεταλλάξεις είναι νέες, δηλαδή οι ασθενείς δεν έχουν οικογενειακό ιστορικό ΚΑΟ.<sup>44</sup> Το είδος της μετάλλαξης δεν συνδέεται με τη βαρύτητα τα νόσου αν και μία πρόσφατη μελέτη συνδέει τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις με ηπιότερη μορφή.<sup>10</sup> Επιπρόσθετα, το είδος της μετάλλαξης δεν σχετίζεται με τη συχνότητα και την εντόπιση των κρίσεων, ενώ πάσχοντες με την ίδια μετάλλαξη (π.χ. μέλη της ίδιας οικογένειας) μπορεί να έχουν τελείως διαφορετική κλινική εικόνα, γεγονός που υποδηλώνει ότι άλλοι επιπρόσθετοι παράγοντες (γενετικοί και περιβαλλοντολογικοί) επηρεάζουν το φαινότυπο της νόσου.<sup>53</sup>

Στο ΚΑΟ, τα επεισόδια χαρακτηρίζονται από εξαγγείωση του πλάσματος στις βαθύτερες στοιβάδες του δέρματος, είτε στο βλεννογόνο του λάρυγγα ή του εντέρου με αντίστοιχη εμφάνιση αγγειοοιδήματος. Ο C1-INH είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας καθώς σε ασθενείς με ΚΑΟ παρατηρούνται τα πολύ χαμηλά επίπεδα του.<sup>54</sup> Σήμερα γνωρίζουμε ότι για όλες τις περιπτώσεις ΚΑΟ το οίδημα οφείλεται στην απελευθέρωση βραδυκινίνης, η οποία αποτελεί τον κύριο μεσολαβητή των κρίσεων.<sup>55</sup>

Αν και η ανεπάρκεια του C1-INH έχει γίνει γνωστό ότι είναι η υποκείμενη αιτία του ΚΑΟ, για περισσότερα από 40 χρόνια, ο πραγματικός μεσολαβητής της αγγειακής διαπερατότητας παρέμενε αντικείμενο συνεχούς έρευνας για αρκετά χρόνια. Επειδή το οίδημα είναι ανώδυνο, και επειδή οι υποδόριες ενέσεις της βραδυκινίνης είναι έντονα επώδυνες, οι ερευνητές αρχικά πίστευαν ότι ένα συστατικό του συμπληρώματος θα είναι ο παράγοντας που αυξάνει την διαπερατότητα.<sup>24</sup> Ένα συστατικό που προέρχεται από το συμπλήρωμα, η κινίνη C2, είχε αρχικά προταθεί ως υποψήφιος μεσολαβητής διαπερατότητας, αλλά οι έρευνες που ακολούθησαν απέτυχαν να επιβεβαιώσουν αυτή την δραστηριότητα.<sup>56,57,58</sup>

Η βραδυκινίνη, ένα εννεαπεπτίδιο που απελευθερώνεται από τη διάσπαση του κινινογόνου από την καλλικρεΐνη, είναι ένα παράγωγο της ενεργοποίησης του συστήματος επαφής. Είναι ικανή να επάγει οίδημα καθώς έχει αγγειοδιασταλτική δράση και αυξάνει την μικροαγγειακή διαπερατότητα. In vivo έρευνες έδειξαν ταχείς αυξήσεις της βραδυκινίνης σε ασθενείς με ανεπάρκεια του C1-INH κατά τη διάρκεια κρίσεων ΚΑΟ.<sup>59,60</sup> Ωστόσο, η ισχυρή σύνδεση της βραδυκινίνης και των κρίσεων αγγειοοιδήματος δεν αποκλείει τη συμμετοχή άλλων παραγόντων στο πλάσμα, όπως η πλασμίνη και η θρομβίνη, στην έναρξη και τη διάρκεια των κρίσεων ΚΑΟ. Κλινικά και πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι ο σχηματισμός θρομβίνης στο μονοπάτι της πήξης αυξάνεται κατά τη διάρκεια των κρίσεων ΚΑΟ,<sup>61</sup> καθώς επίσης και η πλασμίνη και η ινωδολυτική οδός.<sup>62</sup>

Η βιολογική λειτουργία της C1-INH είναι πολύ σημαντική στην παθογένεια του ΚΑΟ καθώς αναστέλλει πολλές πρωτεάσες των μονοπατιών που ευθύνονται για τη νόσο (εικόνα 3). Ο C1-INH είναι ο κύριος ρυθμιστής του συστήματος επαφής και του συστήματος του συμπληρώματος και μπορεί να παίζει έναν δευτερεύοντα ρόλο στην ρύθμιση της πήξης και της ινωδολύσης.<sup>63,64,65,66</sup> Όπως αναφέρθηκε, η μη σωστή ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών, ιδίως του συστήματος επαφής, ως αποτέλεσμα της ανεπάρκειας του C1-INH, είναι ένα κεντρικό σημείο στην παθοφυσιολογία του ΚΑΟ.<sup>38,62</sup> Ο C1-INH αδρανοποιεί τον





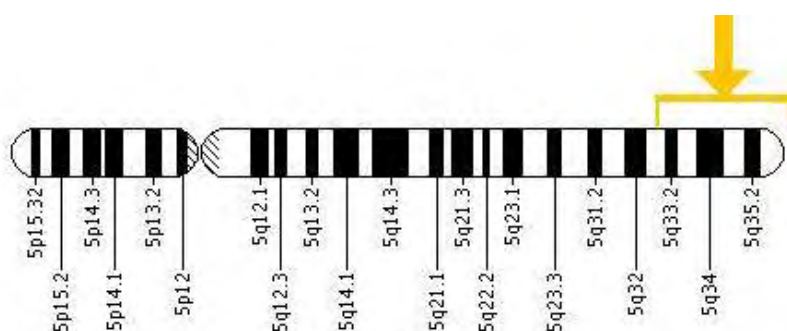
## A6. Παράγοντας Hageman

### A6.1. Ιστορικό υπόβαθρο

Το 1955, ο Oscar Ratnoff και ο Joan Colory περιέγραψαν έναν ασθενή 37 ετών, τον John Hageman, ο οποίος είχε παρατεταμένο χρόνο πήξης του αίματος. Ο ασθενής δεν είχε αιμορραγικά επεισόδια, αν και είχε εξαιρετικά παρατεταμένο χρόνο πήξης του αίματος σε γυάλινους σωλήνες ή σε σωλήνες με επίστρωση σιλικόνης.<sup>72, 73</sup> Ο Oscar Ratnoff έπειτα από πειράματα, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο ασθενής του είχε ανεπάρκεια σε έναν παράγοντα πήξης, άγνωστο μέχρι τότε, που ονόμασε παράγοντα Hageman, από το όνομα του ασθενούς (αργότερα έγινε γνωστός ως FXII). Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι ο FXII κυκλοφορεί στο αίμα ως ένα ανενεργό πρόδρομο ζυμογόνο και όταν ενεργοποιείται καθίσταται ικανός να ενεργοποιεί τον FXI.<sup>74</sup>

### A6.2. Χαρτογράφηση του FXII

Το γονίδιο *FXII* βρίσκεται στο μακρύ (q) βραχίονα του χρωμοσώματος 5 μεταξύ της θέσης 33 και του τέλους του βραχίονα (5q33-5qter). Ακριβέστερα, το γονίδιο *FXII* βρίσκεται από το ζεύγος βάσεων 176 829 138 μέχρι το ζεύγος βάσεων 176 836 576 στο χρωμόσωμα 5 (εικόνα 4). Αρχικά, χαρτογραφήθηκε με την μέθοδο Southern και αργότερα με *in situ* υβριδισμό.<sup>75,76</sup>



Εικόνα 4. Χαρτογράφηση του γονιδίου *FXII* (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/F12>).

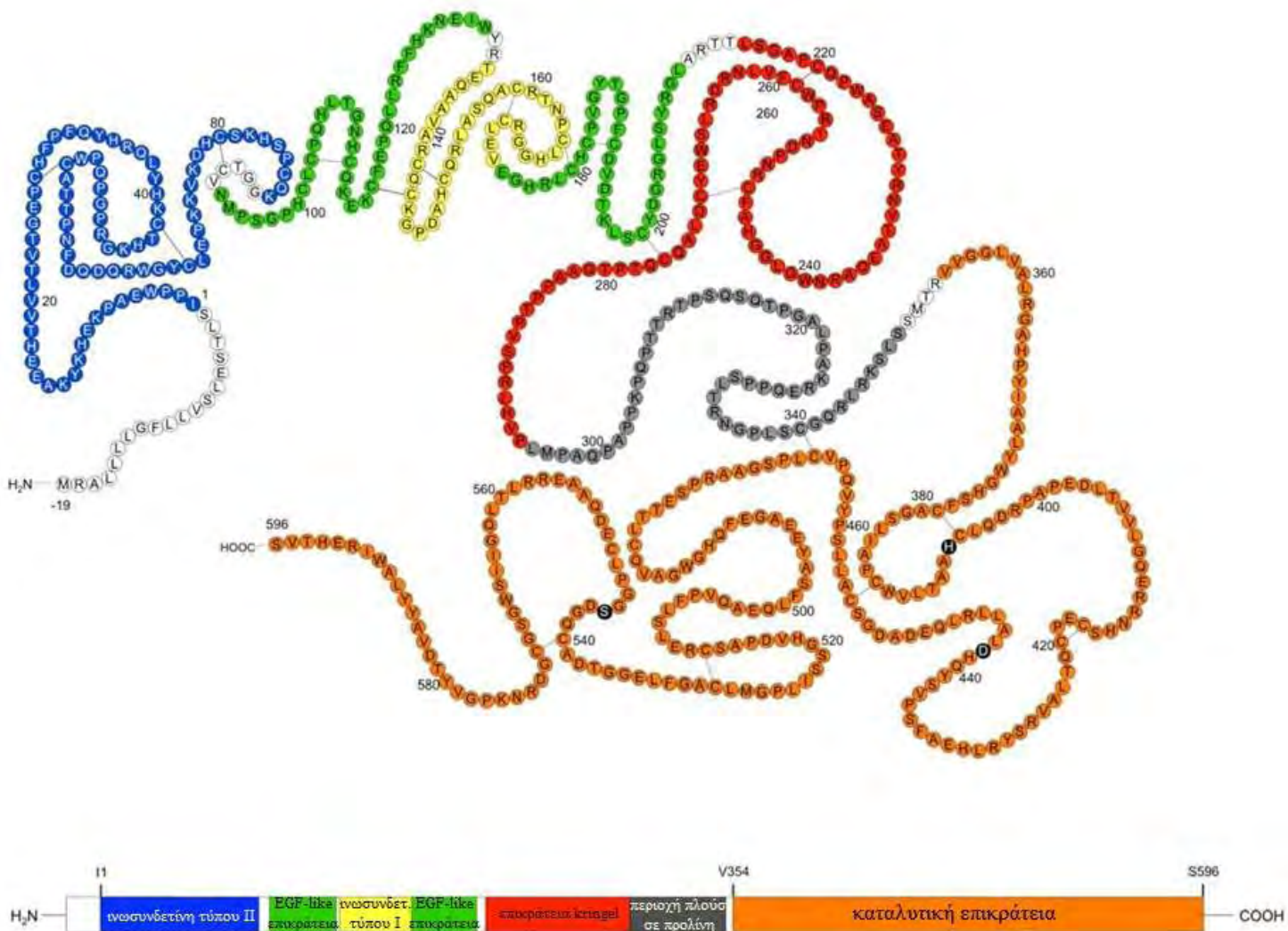
### A6.3. Δομή του FXII

Ο FXII παράγεται και εκκρίνεται από το ήπαρ. Το γονίδιο *FXII* έχει μήκος 12kb και αποτελείται από 13 ιντρόνια και 14 εξόνια. Το ζυμογόνο FXII, αποτελείται από μια βαριά αλυσίδα (353 κατάλοιπα) και μία ελαφριά αλυσίδα (243 κατάλοιπα) που συγκρατούνται μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Ο FXII αποτελείται από πολλές δομικές περιοχές.

Ξεκινώντας από το N-τελικό άκρο, περιλαμβάνει ένα πεπτίδιο οδηγό, μία περιοχή ινοσυνδεΐνης τύπου II, μία ομόλογη του EGF επικράτεια, μία επικράτεια ινοσυνδεΐνης τύπου I, μία δεύτερη ομόλογη του EGF επικράτεια, μία επικράτεια Κρινγκλ (πήρε την ονομασία, καθώς σχηματικά μοιάζει με αρτοποιήματα Σκανδιναβικής προέλευσης)<sup>77</sup>, μία περιοχή πλούσια σε προλίνη και μία καταλυτική περιοχή (εικόνα 5). Εκτός από την πλούσια σε προλίνη περιοχή η οποία είναι μοναδική για τον FXII οι υπόλοιπες παρουσιάζουν ομολογία με εκείνες που βρίσκονται σε άλλες πρωτεάσες σερίνης. Καθεμία από αυτές τις έξι περιοχές του FXII συζητείται λεπτομερώς παρακάτω.

Πινάκας 3. Οι δομικές περιοχές του FXII και ο ρόλος τους.

Επικράτειες	Αλληλουχία αμινοξέων	Υπο-επικράτειες με γνωστή λειτουργική δράση	Ρόλος
Πεπτίδιο οδηγός	-12 - 1		
Ινοσυνδετίνη τύπου II	1 - 88		
		3 -19	Αλληλεπίδραση με FXI
		1 - 28	Περιοχή δέσμευσης σε τεχνικές επιφάνειες
		39 - 47	Περιοχή σύνδεσης σε HUVEC
		40 – 44, 78 - 82	Περιοχές σύνδεσης ψευδαργύρου
Ομόλογη του EGF επικράτεια	94 - 131		Περιοχή σύνδεσης ψευδαργύρου
Ινοσυνδετίνη τύπου I	133 - 173		Περιοχή δέσμευσης ινώδους και ηπαρίνης
		134 - 153	Περιοχή δέσμευσης σε τεχνικές επιφάνειες
EGF-like επικράτεια	174 – 210		Πιθανή περιοχή δέσμευσης σε τεχνικές επιφάνειες
		174 - 146	Πιθανή περιοχή δέσμευσης ψευδαργύρου
Επικράτεια Κρινγκλ	215 - 295		Πιθανή περιοχή δέσμευσης σε τεχνητές επιφάνειες
		193 - 276	Ίσως αυξάνει την ευαισθησία στην πέψη από καλλικρεΐνη
Περιοχή πλούσια σε προλίνη	296 – 349		Άγνωστη
Καταλυτική περιοχή	354 – 595		
		353 - 354	Περιοχή σχηματισμού του α-FXIIa
		H394, D442, S544	Καταλυτική τριάδα ενεργού κέντρου



Εικόνα 5. Δομή του FXII (από Evi Stavrou et al)<sup>78</sup>

Περιοχή ομόλογη με την ινωσυνδετίνη τύπου II .

Το N-τελικό άκρο του FXII έχει κοινή αλληλουχία με τις ομόλογες τύπου II επικράτειες της ινωσυνδετίνης. Τα κατάλοιπα 13-69 του FXII έχουν ομολογία κατά 39% (22 / 57 κατάλοιπα είναι όμοια) και 40% (23 / 57 κατάλοιπα είναι όμοια) με τις αλληλουχίες ινωσυνδετίνης.<sup>79</sup> Οι ομολόγες με την ινωσυνδετίνη τύπου II επικράτειες που περιέχουν την θέση δέσμησης του κολλαγόνου στην ινωσυνδετίνη μπορεί να είναι υπεύθυνες για την ικανότητα σύνδεσης του FXII σε τεχνητές επιφάνειες.<sup>80</sup> Μία προτεινόμενη θέση δέσμησης για αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες, έχει χαρτογραφηθεί στο N-τελικό άκρο του FXII που αποτελείται από τα κατάλοιπα 1-28, που βρίσκονται στην περιοχή ινωσυνδετίνης τύπου II,<sup>81,82</sup> και τα κατάλοιπα 134-153 που βρίσκονται στην περιοχή ινωσυνδετίνης τύπου I

(Πίνακας 1).<sup>83</sup> Ανάλυση της δομής και της λειτουργίας του ανθρώπινου FXII με πρωτεΐνες με κατευθυνόμενες μεταλλάξεις του γονιδίου επιβεβαίωσε ότι το N-τελικό άκρο του FXII περιέχει μία θέση δέσμησης για αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες.<sup>84</sup> Η περιοχή ινোসυνδετίνης τύπου II του FXII περιέχει μία θέση δέσμησης για τον FXI που εκτείνεται από τα αμινοξέα 3 ως τα 19 (Πίνακας 3).<sup>85</sup> Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, ο FXII έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με ενδοθηλιακά κύτταρα, ουδετερόφιλα και αιμοπετάλια.<sup>86,87</sup> Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ένα πεπτίδιο που εκτείνεται από το αμινοξύ 39 ως 47 εμποδίζει την σύνδεση του FXII σε καλλιέργιες ενδοθηλιακών κυττάρων (Πίνακας 1).<sup>88</sup> Επίσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, έχει αποδειχθεί ότι ο FXII αλληλεπιδρά με τον u-PAR, τον gC1qR, και την CK1. Στα αιμοπετάλια, ο FXII συνδέεται με το σύμπλοκο GPIIb-IX-V.<sup>78</sup>

#### *Ομόλογες του EGF επικράτειες*

Δύο επικράτειες του παράγοντα FXII είναι ομόλογες με τον EGF. Η αλληλουχία έχει βρεθεί σε πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένου του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού τύπου 1, του tPA, του uPA και πολλών άλλων παραγόντων πήξης. Σε κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες, υπάρχει μια εξαιρετικά διατηρημένη περιοχή 50 αμινοξέων με εννέα αμετάβλητες κυστεΐνες και κατάλοιπα γλυκίνης.<sup>89</sup>

#### *Επικράτεια ινোসυνδετίνης τύπου I*

Η επικράτεια ινোসυνδετίνης τύπου I χωρίζει τις δύο ομόλογες του EGF επικράτειες. Είναι ένα πεπτίδιο 43 αμινοξέων που έχει περιορισμένη ομολογία με την ινোসυνδετίνη τύπου I. Η ακριβής λειτουργία της δεν είναι γνωστή, αλλά έχει χαρακτηριστεί από τους Citarella *et al* ότι συμμετέχει στην δέσμηση σε τεχνητή επιφάνεια.<sup>90</sup>

#### *Επικράτεια Κρινγκλ*

Ένας άλλο είδος ομολογίας που βρέθηκε στον FXII είναι η επικράτεια Κρινγκλ. Είναι 80 αμινοξέα σε μήκος και έχει τρεις χαρακτηριστικούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Η επικράτεια Κρινγκλ μεταξύ του FXII και του tPA, έχει περίπου 41% ομολογία. Η λειτουργία της στον FXII είναι ασαφής, αλλά έχει προταθεί ως μία πιθανή θέση πρόσδεσης σε τεχνητή επιφάνεια.<sup>78</sup>

#### *Περιοχή πλούσια σε προλίνη*

Την επικράτεια Κρινγκλ ακολουθεί μία περιοχή στην οποία το 33% των καταλοίπων είναι προλίνη, όμως δεν έχει καμία ομολογία με άλλες πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη. Η σημασία αυτής της περιοχής στον FXII παραμένει απροσδιόριστη.<sup>78</sup>

## Καταλυτική επικράτεια

Η καταλυτική επικράτεια του FXII είναι η μεγαλύτερη και η καλύτερα μελετημένη περιοχή της πρωτεΐνης. Το ενεργό κέντρο του FXIIa (είναι η ενεργοποιημένη μορφή του FXII) αποτελείται από 3 αμινοξέα: το H394, το D442 και το S544. Η πρωτεολυτική διάσπαση στη θέση R353-V354 μετατρέπει την ενιαία αλυσίδα του ζυμογόνου FXII (80 kDa) σε α-FXIIa. *In vivo*, αυτή η πρωτεΐνη κυκλοφορεί ως πρωτεΐνη δύο αλυσίδων, μία βαριά αλυσίδα των 50 kDa (353 κατάλοιπα) και μια ελαφριά αλυσίδα των 30 kDa (243 κατάλοιπα) που συγκρατούνται μαζί από ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ δύο κυστεϊνών. Η αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού ελευθερώνει την ελαφριά αλυσίδα ως β-FXIIa.<sup>91,92</sup> Αν και διατηρεί την πρωτεολυτική δραστηριότητα έναντι των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, ο β-FXIIa δεν είναι σε θέση να συνδέεται με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες και συνεπώς να επάγει την πήξη.<sup>93</sup>

Αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες όπως το γυαλί, η καολίνη, το ελλαγικό οξύ, το σουλφατίδιο, τα μικκύλια, η υψηλή μοριακού βάρους θειϊκή δεξτράνη, το υπογαλλικό βισμούθιο, το πολυαιθυλένιο, το λάστιχο σιλικόνης και διάφορα πολυμερή επάγουν την αυτοενεργοποίηση του FXII. Από την άλλη, οι βιολογικές ουσίες που ενεργοποιούν τον FXII είναι ο αρθρικός χόνδρος, το δέρμα, τα λιπαρά οξέα, η ενδοτοξίνη, οι κρύσταλλοι ουρικού νατρίου, το πυροφωσφορικό ασβέστιο, η L-ομοκυστεΐνη, η αιματίνη, οι πρωτοπορφυρίνες, οι ηπαρίνες, η χονδροϊτίνη, το θειικό οξύ, η φωσφατιδυλοσερίνη, η φωσφατιδυλογλυκερίνη, το φωσφατιδικό οξύ και η φωσφατιδυλινοσιτόλη.<sup>78</sup>

## A6.4. Φυσιολογικός ρόλος του FXII

Αναφορικά για την έκφραση του FXII, λίγα δεδομένα έχουν γίνει γνωστά. Το γονίδιο *FXII* χαρακτηρίζεται από ρυθμιστικές περιοχές στον υποκινητή του (HRE) οι οποίες αλληλεπιδρούν με οιστρογόνα, ενώ είναι γνωστό ότι η θεραπεία με οιστρογόνα αυξάνει την παραγωγή του ηπατικού FXII.<sup>94</sup>

Ο FXII είναι μια πρωτεΐνη απαραίτητη για την πήξη του αίματος. Η ανεπάρκεια του FXII δεν σχετίζεται με αιμορραγική διάθεση. Οι Spronk *et al* έδειξαν ότι ο TF είναι ο φυσιολογικός εκκινητής της πήξης του αίματος που οδηγεί σε αιμόσταση.<sup>95</sup> Τα ποντίκια με FXII ανεπάρκεια και ταυτόχρονα χαμηλή έκφραση του TF είναι βιώσιμα και φαινοτυπικά παρόμοια με τα ποντίκια που έχουν χαμηλή έκφραση TF με κανονική έκφραση του FXII. Σε

αντίθεση, η ανεπάρκεια του FXI σε συνδυασμό με χαμηλά επίπεδα TF έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο των ζώων.<sup>95</sup> Έτσι, παρά το γεγονός ότι ο FXII δεν είναι απαραίτητος για την αιμόσταση *in vivo*, αποτελεί απαραίτητο διαγνωστικό παράγοντα στην διάγνωση πιθανόν διαταραχών της αιμόστασης *in vitro*.<sup>96</sup>

Νέο ενδιαφέρον για τον FXII έχει προκύψει από την παρατήρηση ότι τα ποντίκια με FXII ανεπάρκεια εμφανίζουν καθυστερημένους χρόνους στην επαγωγή της αρτηριακής θρόμβωσης χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές.<sup>97,98</sup> Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι ο FXII στον αναπτυσσόμενο θρόμβο συνεισφέρει στην επέκταση της θρόμβωσης. Ο μηχανισμός δεν έχει περιγραφεί με ακρίβεια, αλλά πιστεύεται ότι σχετίζεται με την αυτοενεργοποίηση του FXII κατά την επαφή του με ουσίες όπως τα πολυφωσφορικά των αιμοπεταλίων, το εξωκυτταρικό RNA και το κολλαγόνο στα αρτηρικά τοιχώματα.<sup>99,100</sup> Ωστόσο, δεν έχει βρεθεί ο FXIIa σε αναπτυσσόμενους ή ανεπτυγμένους θρόμβους. Η έκθεση σε κολλαγόνο οδηγεί σε αυτοενεργοποίηση του FXII, η οποία σε ρέον αίμα συμβάλλει στην έκταση του θρόμβου.<sup>101</sup> Αναστολή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων ή της δραστηριότητας του FXIIa στους αναπτυσσόμενους θρόμβους σε ρέον αίμα μειώνει το σχηματισμό θρόμβου. Αυτές οι συνδυασμένες μελέτες υποδηλώνουν ότι οι αναστολείς του FXIIa μπορούν να μειώσουν την έκταση των αρτηριακών θρόμβων σε ρέον αίμα. Οι αναστολείς του FXIIa ενδέχεται να είναι κλινικά χρήσιμοι για την μείωση του θρόμβου σε νόσους των στεφανιαίων αρτηριών και σε εγκεφαλικά επεισόδια. Οι παραπάνω έρευνες σε μοντέλα ποντικών δεν έχουν πάντα αντίστοιχα αποτελέσματα και σε κλινικές μελέτες.<sup>78</sup>

Για πάνω από σαράντα χρόνια οι έρευνες δεν είχαν θεωρήσει τον FXII σημαντικό στην αιμόσταση, επειδή η έλλειψή του δε σχετίζεται με αιμορραγία. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες με ποντικούς με ανεπάρκεια του FXII, δείχνουν ότι συμβάλλει, ως ένα βαθμό, στην ανάπτυξη του θρόμβου στο ενδοαγγειακό διαμέρισμα.<sup>55</sup> Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι έχει ρόλο στον σχηματισμό θρόμβου χωρίς να επηρεάζει την αιμόσταση.<sup>55</sup> Ο FXII επίσης συμμετέχει και στο σύστημα επαφής ή αλλιώς στο σύστημα κίνησης-καλλικρεΐνης.<sup>54</sup>

## **A6.5. Ο πολυμορφισμός C46T του γονιδίου του FXII**

Πολλές από τις λειτουργίες του FXII καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του έχει δειχθεί ότι επηρεάζονται από τον πολυμορφισμό 5046T>C (rs1801020, g.5046T>C, γνωστός

ως C46T, c.-3T>C, συχνότητα T αλληλομόρφου 0,8). Επιπλέον, έχει βρεθεί συσχέτιση αυτού του πολυμορφισμού με παθολογικές καταστάσεις.

Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι ο FXII μπορεί να σχετίζεται με θρόμβωση των στεφανιαίων αρτηριών.<sup>102,103</sup> Ο πολυμορφισμός βρίσκεται στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *FXII*, η υποκατάσταση 46C > T, δημιουργεί ένα καινούργιο κωδικόνιο έναρξης (ATG) για την μεταγραφή του mRNA. Επομένως, μεταβάλλεται το πλαίσιο ανάγνωσης και παράγεται μία μικρότερη πρωτεΐνη,<sup>104</sup> που οδηγεί τελικά σε μειωμένα επίπεδα του FXII στο πλάσμα.<sup>105</sup> Τα χαμηλά επίπεδα του FXII προσφέρουν προστασία ενάντια στο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και μειώνουν τον κίνδυνο θρόμβωσης.<sup>106,107</sup> Ο γονότυπος G/G αυτού του πολυμορφισμού σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.<sup>108</sup> Τα αποτελέσματα από μελέτη για το έμφραγμα του μυοκαρδίου-Leiden (SMILE) δείχνουν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ των επιπέδων FXII και του κινδύνου εμφράγματος του μυοκαρδίου.<sup>109</sup> Εντούτοις, η θνησιμότητα για τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα FXII (1-10% του φυσιολογικού) είναι παρόμοια με τη θνησιμότητα του γενικού πληθυσμού.<sup>110</sup> Αυτά τα κλινικά δεδομένα δεν συμφωνούν απολύτως με τις παρατηρήσεις σε ποντίκια με FXII ανεπάρκεια. Τα χαμηλά επίπεδα του FXII σε ποντίκια knockout δεν προστατεύουν από αρτηριακή θρόμβωση όπως θα αναμενόταν. Επιπλέον, οι Bach *et al* δεν επιβεβαίωσαν αυτές τις συσχετίσεις του πολυμορφισμού σε ασθενείς με καρδιακές ασθένειες<sup>111</sup>, καθώς επίσης και οι Qi L *et al* δεν βρήκαν κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού με την ηλικία έναρξης του εμφράγματος του μυοκαρδίου.<sup>112</sup>

Ο παραπάνω πολυμορφισμός μελετήθηκε επίσης σε γυναίκες με ιδιοπαθείς συνεχείς αποβολές χωρίς να βρεθεί κάποια συσχέτιση.<sup>113</sup> Συσχέτιση δεν βρέθηκε ούτε σε ασθενείς με απόφραξη φλέβας του αμφιβληστροειδούς (BRVO), στους οποίους η υπέρταση αποτελεί παράγοντα κινδύνου.<sup>114</sup>



## A7. Υποδοχείς BK

### A7.1. Ιστορικό υπόβαθρο

Πραγματική πρόοδο στην ανάλυση των υποδοχέων που αναγνωρίζουν κινίνες άρχισε να γίνεται στα τέλη της δεκαετίας του 1970, παρά την επιτυχή χημική σύνθεση της BK μια δεκαετία νωρίτερα. Αυτή η καθυστέρηση μπορεί να οφείλεται σε τρεις κύριους παράγοντες.<sup>4</sup> Πρώτον, υπήρξαν προβλήματα στην επιλογή αξιόπιστων *in vitro* παρασκευασμάτων βιοδοκιμασίας για την εκτίμηση της δραστηριότητας των κινινών, δεδομένου ότι πολλές από τις δράσεις των κινινών ήταν έμμεσες (π.χ. μέσω της αποδέσμευσης παραγόντων ενδοθηλιακής προέλευσης, προσταγλανδινών, κατεχολαμινών ή ακετυλοχολίνης).<sup>115</sup> Δεύτερον, ήταν περιορισμένη η διαθεσιμότητα των φυσικώς απαντώμενων κινινών, ειδικά αυτών που έχουν διαφορετική εξειδίκευση για τους δύο τύπους υποδοχέων BK. Τρίτον, και πιο σημαντικό, ήταν η έλλειψη, μέχρι τα τέλη του 1970, των συνθετικών προσδετών ειδικών για τους δύο τύπους υποδοχέων BK.<sup>116</sup>

Ως εκ τούτου, το αρχικό σύστημα ταξινόμησης για τους υποδοχείς BK, κατ' ανάγκη, βασίστηκε σε ουσιαστικά φαινομενικές παρατηρήσεις. Ωστόσο, το σύστημα αυτό είχε μικρή διάρκεια λόγω της έλλειψης οποιασδήποτε θεωρητικής φαρμακολογικής βάσης.<sup>4</sup>

### A7.2. Το σύστημα ταξινόμησης των BK υποδοχέων

Το πιο επιτυχημένο σύστημα ταξινόμησης μέχρι σήμερα βασίζεται σε φαρμακολογικά κριτήρια της αλληλεπίδρασης φαρμάκου-υποδοχέα. Αυτά είναι: (i) η σχετική δραστηριότητα των αγωνιστών, (ii) η συγγένεια των ανταγωνιστών σε λειτουργικές μελέτες και (iii) η συγγένεια ή σειρά κατάταξης της δραστηριότητας με βάση την εκτόπιση από αγωνιστές και ανταγωνιστές σε μελέτες σύνδεσης ραδιενεργού προσδέτη.<sup>4</sup> Η πρώτη απόδειξη για αυτούς τους τύπους υποδοχέων της BK αναφέρθηκε σε δύο εργασίες που δημοσιεύθηκαν στο *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* από τους Regoli *et al* το 1977,<sup>116</sup> οι οποίοι παρουσίασαν φαρμακολογικά δεδομένα που υποστήριζαν την ύπαρξη τουλάχιστον δύο διαφορετικών τύπων υποδοχέα για την BK.<sup>117</sup> Η διάκριση των υποδοχέων B1 και B2 γίνεται σύμφωνα με την σειρά κατάταξης της ισχύος των αγωνιστών:

- B1 υποδοχείς (μελέτες σε αορτή κουνελιού): des-Arg<sup>9</sup>-BK > Tyr (Me)<sup>8</sup>-BK > BK

- B2 υποδοχείς (μελέτες σε φλέβα κουνελιού, καρωτιδική αρτηρία σκύλου, ειλεό γάτας, μήτρα αρουραίου): Tyr (Me)<sup>8</sup>-BK > BK > des-Arg<sup>9</sup>-BK.<sup>4</sup>

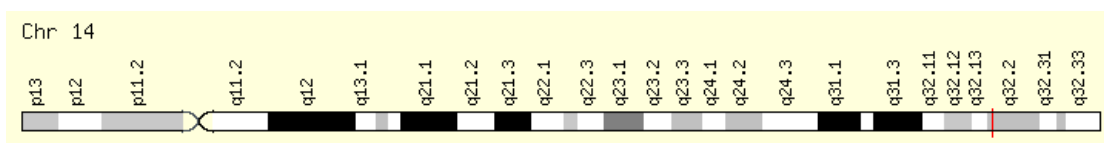
### A7.3. Γενικές πληροφορίες

Η BK όπως προαναφέρθηκε, σχηματίζεται κατά την ενζυματική πέψη του κινινογόνου από τις PK και ασκεί τις βιολογικές της επιδράσεις μέσω των B1 και B2 υποδοχέων. Οι δύο τύποι υποδοχέων ανήκουν στην υπερικογένεια των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (εικόνα 7).<sup>118</sup>

#### B1 υποδοχείς

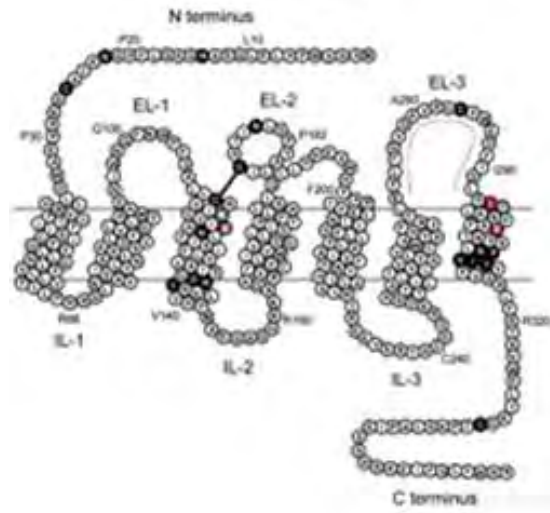
Οι Menken *et al* το 1994 απομόνωσαν ένα cDNA που κωδικοποιεί τον *BDKRB1*, ή B1R, από ανθρώπινα εμβρυϊκά πνευμονικά ινοβλαστικά κύτταρα. Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης αυτού κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 353 αμινοξέων και έχει τα χαρακτηριστικά υποδοχέα που συνδέεται με G-πρωτεΐνες.<sup>119</sup> Παρουσιάζει κατα 36% ομολογία με τον B2 υποδοχέα. Χρησιμοποιώντας RT-PCR ανάλυση Southern blot, οι Chai *et al* βρήκαν ότι το γονίδιο του υποδοχέα B1 έχει ευρεία έκφραση στους ιστούς. Η ανάλυση Northern blot προσδιόρισε ώριμο μετάγραφο mRNA (1,7 έως 1,8-kb) στους νεφρούς και στο πάγκρεας.<sup>120</sup> Οι Bachvaron *et al* έδειξαν ότι το γονίδιο του *BDKRB1* περιέχει 3 εξώνια, εκ των οποίων τα δύο πρώτα περιέχουν μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες. Ένα κουτί TATA υπάρχει στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του εξωνίου 1.<sup>121</sup> Με *in situ* υβριδισμό, οι Chain *et al* χαρτογράφησαν το *BDKRB1* γονίδιο στο χρωμόσωμα 14q32.1-q32.2, σε στενή γειτνίαση με το γονίδιο του υποδοχέα B2 (εικόνα 6).<sup>122</sup>

Η έκφραση των B1 υποδοχέων αυξάνεται μετά από συγκεκριμένους τύπους τραύματος. Συνήθως, οι υποδοχείς λείπουν φυσιολογικά από τους ιστούς και επάγονται κάτω από την επίδραση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων.<sup>123</sup> Έχει παρατηρηθεί επαγωγή της μεταγραφής τους από την IL-1 στους ινοβλάστες,<sup>124</sup> και δεν αποκλείεται οι B1 υποδοχείς να εκφράζονται ιδιοστατικά σε μερικά όργανα όπως οι νεφροί.<sup>125, 126</sup>



Εικόνα 6. Χαρτογράφηση του γονιδίου *BRB1R* (από <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BDKRB1>)

## Β1 υποδοχέας



Εικόνα 7. Δομή των Β1 υποδοχέων (από Fredrik et al)<sup>127</sup>

### A7.4. Φυσιολογία των Β1 υποδοχέων

Η μελέτη της συμμετοχής των κινινών και των υποδοχέων τους στην φυσιολογία και την παθοφυσιολογία είναι δυνατή με την χρήση των ανταγωνιστών των υποδοχέων ΒΚ. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή των ανταγωνιστών του υποδοχέα ΒΚ *in vivo*, εφόσον οι επιδράσεις τους στις ενδογενείς κινίνες μπορούν να ερευνηθούν.<sup>128</sup>

Πίνακας 4. Ιστοί και συστήματα που παίζουν ρόλο οι B1 υποδοχείς.

<b>Γαστρεντερικός λείος μυς</b>	Χαλάρωση ή συστολή των μυών καθώς και την απελευθέρωση μεσολαβητών όπως οι προσταγλαδίνες ή οι νευροδιαβιβαστές. <sup>128</sup>
<b>Μεταφορέας ιόντων των επιθηλιακών κυττάρων</b>	Συμβολή σε καταστάσεις όπως η IBD. <sup>129,130</sup> Διέγερση της έκκρισης χλωρίου στον ειλεό μέσω των υποδοχέων BK του βλεννογόνου. <sup>131,132</sup>
<b>Ουρογεννητικό σύστημα</b>	Σύσπαση της ουροδόχου κύστης. <sup>133</sup> Διέγερση των συμπαθητικών νεύρων. Αύξηση της λειτουργία των σπειραματικών σωληναρίων.
<b>Αναπνευστική οδός</b>	Βρογχοσυστολή. <sup>134</sup>
<b>Ομοιόσταση του κυκλοφορικού</b>	Είτε συστολή είτε διαστολή των λείων μυών των αγγείων μέσω της απελευθέρωσης ενδιάμεσων μεσολαβητών όπως οι προσταγλανδίνες ή οι ενδοθηλιακοί παράγοντες (όπως το NO). <sup>128</sup>
<b>Κυτταρική ανάπτυξη και μίτωση</b>	Μιτογόνο δράση σε μυϊκά κύτταρα. Σε ινοβλάστες εμβρυϊκού πνεύμονα, προάγουν τον σχηματισμό του κολλαγόνου, την κυτταρική διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό. <sup>135</sup>
<b>Φλεγμονή</b>	Οι υποδοχείς B1 επάγονται ως απάντηση στη βλάβη κάποιου ιστού ή σε άλλους παράγοντες της φλεγμονώδους απόκρισης όπως είναι οι κυτοκίνες. <sup>136</sup> Παίζουν ρόλο σε χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, όπως η περιοδοντίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η οστεομυελίτιδα. <sup>137</sup>

Πινάκας 5. Συγκεντρωτικές πληροφορίες για τους B1 υποδοχείς ([http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/RBI\\_Handbook/sg\\_ls\\_cs\\_rbibook\\_bradyk.Par.0001.File.tmp/sg\\_ls\\_cs\\_rbibook\\_bradyk.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/RBI_Handbook/sg_ls_cs_rbibook_bradyk.Par.0001.File.tmp/sg_ls_cs_rbibook_bradyk.pdf))

Συγκεντρωτικές πληροφορίες	B1
Πληροφορίες για την δομή	BK(1-8) (B4397), Lys-BK(1-8), Lys-BK, Sar[D-Phe <sup>8</sup> ]-BK(1-8)
Τύποι εκλεκτικών ανταγωνιστών	[Leu <sup>8</sup> ]-BK(1-8), Lys-[Leu <sup>8</sup> ]-BK(1-8), NPC 17731, [des-Arg <sup>10</sup> ]-HOE 140 (H158), B9958
Μηχανισμός μεταγωγής σήματος	G <sub>q/11</sub> (αύξηση IP <sub>3</sub> /DAG)
Ιστός έκφραση	Επάγεται μετά τον τραυματισμό των ιστών στα περισσότερα κύτταρα και ιστούς
Συσχέτιση με ασθένειες	φλεγμονή, οίδημα, πόνος, μόλυνση/σήψη, άσθμα, νεφρική/καρδιακή προστασία, όγκος/αγγειογένεση, διαβήτης

### A7.5. Ο πολυμορφισμός -699G>C του γονιδίου του *BDKRB1*

Πολλές από τις λειτουργίες του B1 υποδοχέα καθώς και τα επίπεδα έκφρασης του έχειδειχθεί ότι επηρεάζονται από τον παραπάνω πολυμορφισμό. Επιπλέον, έχει βρεθεί συσχέτιση του πολυμορφισμού με παθολογικές καταστάσεις και νοσήματα.

Ο πολυμορφισμός έχει ταυτοποιηθεί στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *BDKRB1* στη θέση -699G>C (rs4905475, g.96721850G>C, c.-220-697G>C, συχνότητα C αλληλομόρφου 0,875).<sup>138</sup> Η παρουσία της κυτοσίνης αυξάνει την μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή. Οι Bachvaron *et al* βρήκαν ότι ο παραπάνω πολυμορφισμός είναι πιο συχνός στους υγιείς μάρτυρες από ότι σε ασθενείς με ουραιμία, η οποία προκαλείται από πολυκυστικούς νεφρούς, πυελονεφρίτιδα και διάμεση νεφρίτιδα και σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια.<sup>138</sup> Οι Kinigge *et al* και Zychma *et al* δε βρήκαν διαφορά στη συχνότητα του -699C αλληλομόρφου μεταξύ διαβητικών και μη διαβητικών ασθενών με νεφρική ασθένεια.<sup>139,140</sup> Ομοίως, σε άλλη μελέτη δε βρέθηκε διαφορά στην συχνότητα

του αλληλομόρφου μεταξύ ασθενών με μη διαβητική νεφρική ανεπάρκεια τελευταίου σταδίου και ασθενών με διαβητική νεφρική ανεπάρκεια (τελευταίου σταδίου ή μη).<sup>141</sup>

Επιπλέον, ο παραπάνω πολυμορφισμός έχει συσχετιστεί με καρδιαγγειακό κίνδυνο σε μεσήλικες άνδρες. Παρουσία του B1R-669G αλληλομόρφου ο καρδιαγγειακός κίνδυνος αυξάνεται καθώς ανεβαίνει η πίεση του αίματος, ενώ δεν εντοπίστηκε επίδραση στους ομοζυγώτες για το B1R-669C αλληλόμορφο. Επιπροσθέτως, η επίδραση του γονότυπου είναι πιο έντονη σε εκείνους που πάσχουν από συστολική υπέρταση.<sup>142</sup>

Οι Bachvarov *et al* μελέτησαν τον πολυμορφισμό B1R-669C και στην IBD και βρήκαν σημαντική διαφορά στη συχνότητα ανάμεσα σε ασθενείς και φυσιολογικούς. Συγκεκριμένα, το C αλληλόμορφο βρέθηκε στο 5,7% των ασθενών και στο 33,6% των φυσιολογικών. Έτσι, πρότειναν ότι ο πολυμορφισμός είναι ένας μη αιτιολογικός παράγοντας της συμπτωματικής IBD που επηρεάζει τον φαινότυπο της νόσου.<sup>143</sup>

## A8. Ερευνητική υπόθεση

Η κλινική εκδήλωση του ΚΑΟ, καθώς και η βαρύτητα ειδικών συμπτωμάτων, η ηλικία έναρξης και η ανταπόκριση στη θεραπεία, καθορίζονται από μία βλάβη στο γονίδιο του *C1-1HN* και από την αλληλεπίδρασή του με άλλους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Κατανόηση αυτών των παραγόντων μπορεί να βοηθήσει στο να εκτιμηθεί καλύτερα η πορεία και η πρόγνωση της ασθένειας και ίσως να προταθούν καινούργιοι θεραπευτικοί στόχοι.

Οι μελέτες πολυμορφισμού είναι ένα επιδημιολογικό εργαλείο, χρήσιμο στην συσχέτιση νόσων και παθολογικών καταστάσεων με διάφορους πολυμορφισμούς. Οι πολυμορφισμοί των γονιδίων *FXII*, και *BDKRB1* αναφέρθηκε παραπάνω ότι επηρεάζουν την παθογένεση και τον φαινότυπο διάφορων ασθενειών.

Η BK θεωρείται σημαντικός μεσολαβητής του οιδήματος στο ΚΑΟ. Έτσι, είναι καίριο να μελετούνται παράγοντες που τροποποιούν τις κλινικές εκδηλώσεις του οιδήματος, όπως τα γονίδια *BDKRB1* και *BDKRB2*. Ένας από τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο *BDKR2*, είναι ο rs71103505. Πρόκειται για την έλλειψη εννέα βάσεων (9bp/-9bp) στην 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου (g.96671208\_96671216delGGTGGGGAC, c.-123\_-115delGGTGGGGAC, συχνότητα περίπου 0,14). Η απουσία των εννέα βάσεων σχετίζεται με υψηλότερη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου που συνεπάγεται

αυξημένο αριθμό Β2 υποδοχέων.<sup>144,145</sup> Σε μία έρευνα που έγινε σε ασθενείς με ΚΑΟ,<sup>146</sup> βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός σχετίζεται με την ασθένεια (εξετάστηκαν μόνο 21 ασθενείς), άλλη αντίστοιχη που ακολούθησε δεν επιβεβαίωσε τα πρώτα αποτελέσματα.<sup>147</sup> Ένας άλλος πολυμορφισμός στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *BDKRB2* είναι ο rs1799722 (g.96671139C>T, c.-191C>T, γνωστός ως -58C>T, συχνότητα T αλληλομόρφου περίπου 0,45) επίσης δεν σχετίστηκε με το φαινότυπο του ΚΑΟ.<sup>148</sup>

Έχει πραγματοποιηθεί μία μελέτη και για τον πολυμορφισμό B1R-669C. Οι Freiburger *et al* κατέληξαν ότι ο πολυμορφισμός δεν επηρεάζει τον φαινότυπο του ΚΑΟ. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι η μελέτη διεξήχθη σε έναν περιορισμένο αριθμό ετερογενών ασθενών.<sup>148</sup> Για το τον πολυμορφισμό 46T> C έχει επίσης δημοσιευτεί μία ερευνητική δουλειά.<sup>10</sup> Σε αυτή ο πολυμορφισμός συσχετίστηκε με την ηλικία έναρξης της ασθένειας και συγκεκριμένα οι ασθενείς με γονότυπο CC εκδηλώνουν πιο πρώιμα τη νόσο. Η εύρεση ή ακόμα η κατανόηση της επίδρασης αυτών των πολυμορφισμών μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη εκτίμηση της πορείας της νόσου και στην πρόγνωση της ασθένειας, και ενδεχομένως στο να προταθούν καινούργιοι θεραπευτικοί στόχοι.

## A9. Σκοπός

Επειδή, ο FXII είναι ένα από τα τέσσερα συστατικά του συστήματος επαφής το οποίο συμμετέχει στον μοριακό μηχανισμό της νόσου<sup>149</sup> και επειδή, οι επιδράσεις της βραδυκινίνης διαμεσολαβούνται μέσω των υποδοχέων της βραδυκινίνης<sup>150</sup> ίσως οι πολυμορφισμοί σε αυτά τα γονίδια να παίζουν κάποιο ρόλο στη σοβαρότητα ή τη συχνότητα του ΚΑΟ. Ο πολυμορφισμός του γονιδίου *FXII*, rs1801020 (g.5046T> O, c.-3T> C), συνδέεται με τα επίπεδα του FXII. Άτομα ομόζυγα για αυτό τον πολυμορφισμό (CC) έχουν χαμηλότερα επίπεδα FXII.<sup>151</sup> Επίσης, το C αλληλόμορφο του πολυμορφισμού -699G> C (rs4905475) στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου *BDKRB1*, συσχετίζεται με μεγαλύτερη ποσότητα mRNA και υψηλότερη δραστηριότητα του προαγωγέα.<sup>138</sup> Έτσι, οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορεί να επηρεάσουν την παθογένεια και τον φαινότυπο της νόσου. Γι αυτό το λόγο μελετήθηκε ο πιθανός τους ρόλος σε ασθενείς με ΚΑΟ.

Οι παραπάνω πολυμορφισμοί μελετήθηκαν σε 123 ασθενείς με ΚΑΟ (ανεξάρτητου τύπου) και ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν περίπου 100 φυσιολογικοί μάρτυρες. Αρχικά, έγινε απομόνωση DNA σε δείγματα ασθενών αλλά χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα από το αρχείο του εργαστηρίου. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του DNA με

αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και πέψη των προϊόντων ενίσχυσης με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού ώστε να προσδιοριστεί ο γονότυπος.



## **B. Ειδικό Μέρος- Υλικό και Μεθοδολογία**

### **B1. Υλικό**

#### **B1.1. Βιολογικό Υλικό**

Στην παρούσα έρευνα μελετήσαμε σε μοριακό επίπεδο άτομα από διαφορετικές οικογένειες με κληρονομικό αγγειοίδημα τύπου I και II από τους οποίους έχουμε πλήρεις κλινικές πληροφορίες και προέρχονται από τρεις χώρες, Ελλάδα, Γερμανία και Ρουμανία.

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας περιελάμβανε δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών που ήταν στην διάθεση μας από συλλογή του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Λάρισα). Η συλλογή του υλικού έγινε κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριο του 2011 με Ιούνιο του 2013 με την βοήθεια διαγνωστικών κέντρων και νοσοκομείων της Ελλάδας, της Γερμανίας και της Ρουμανίας. Όλοι οι ασθενείς πληρούσαν τουλάχιστον ένα σημαντικό κλινικό κριτήριο και ένα εργαστηριακό κριτήριο, μαζί με θετικό οικογενειακό ιστορικό, σύμφωνα με τις τελευταίες κατευθυντήριες γραμμές για τη διάγνωση του κληρονομικού αγγειοιδήματος.<sup>50</sup> Συγκεκριμένα όλοι οι ασθενείς εμφανίζουν υποτροπιάζοντα επεισόδια αγγειοιδήματος, με μειωμένα αντιγονικά επίπεδα του C1INH και του παράγοντα C4 και φυσιολογικά επίπεδα C1q και C3. Επιπλέον, στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν 21 ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό νόσου και 11 ασυμπτωματικοί ασθενείς.

Για το σκοπό της εργασίας κρίθηκε απαραίτητη η καταγραφή του οικογενειακού ιστορικού καθώς και των δημογραφικών στοιχείων των ασθενών. Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών όπως και ο διαχωρισμός των ασθενών με βάση την κλινική εκδήλωση της νόσου στηριζόμενοι στην βιβλιογραφία,<sup>152</sup> συνοψίζονται στον Πίνακα

Πίνακας 6. Δημογραφικά στοιχεία ασθενών και φαινοτυπικοί παράμετροι που αξιολογήθηκαν.

	Συνολικά	Γερμανία	Ρουμανία	Ελλάδα
Αριθμός (οικογενειών, ασθενών)	72, 123	18, 28	14, 20	40, 75
Φύλο (άνδρες/ γυναίκες)	59, 64	12, 16	7, 13	39, 36
Ηλικία ανάλυσης (μέση τιμή, εύρος)	38.5, 2-81	41.2, 13-81	37.5, 10-72	37.4, 2-80
Έναρξη των συμπτωμάτων (μέση τιμή, εύρος)	14.6, 1-70	12.3, 3-28	26.3, 2-70	12.3, 1-57
Ηλικία διάγνωσης (μέση τιμή, εύρος)	29.1, 2-78	28.8, 3-78	36.2, 10-70	29.4, 2-78
Καθυστέρηση διάγνωσης (μέση τιμή, εύρος)	14.9, 0-72	10.2, 0-72	8.7, 0-52	18.5, 0-58
Χωρίς οικογενειακό ιστορικό (N, %)	21, 17.1	10, 35.7	1, 5.0	10, 13.5
ΚΑΟ τύπου I (N,%)	106, 86.2	25, 93.0	18, 90.0	63, 84.0
ΚΑΟ τύπου II (N,%)	17, 13.8	3, 7.0	2, 10.0	12, 16.0
Ασθενείς με κρίσεις στο λάρυγγα (N, %)	62, 50.4	13, 46.3	12, 60.0	37, 49.3
Ασθενείς με κρίσεις στην κοιλιακή χώρα (σπάνια, συχνά, κυρίως, N, %)	27 (22.0) 55 (44.7) 34 (27.6)	7 (25.0) 16 (57.1) 5 (17.9)	1 (5.0) 12 (60.0) 6 (30.0)	19 (25.3) 27 (36.0) 23 (30.7)
Ασθενείς σε θεραπεία μακράς διάρκειας (N, %)	48, 39.0	9, 32.1	3, 15.0	36, 48.0

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 105 υγιή άτομα από την βάση δειγμάτων του εργαστηρίου Ανοσολογίας- Ιστοσυμβατότητας, που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (Control Group), για την εκτίμηση του επιπολασμού του εξεταζόμενου πολυμορφισμού στο γενικό ελληνικό πληθυσμό. Από αυτούς οι 51 ήταν άνδρες και οι 49 γυναίκες, με μέση ηλικία 62,5 έτη, ηλικιακό εύρος 10 έως 90 ετών. Η τιμή της μέσης ηλικίας είναι διαφορετική από την ομάδα των ασθενών με ΚΑΟ.

Πίνακας 7. Δημογραφικά στοιχεία ομάδας φυσιολογικών μαρτύρων.

Φυσιολογικοί μάρτυρες	Συνολικά
Αριθμός	101
Φύλο (άνδρες/ γυναίκες)	51/ 50
Ηλικία (μέση τιμή/ εύρος)	62,1/ 10-90
Καταγωγή	Ελληνική

Όλα τα δείγματα προήλθαν από ανεξάρτητα άτομα, Ελληνικής, Γερμανικής και Ρουμανικής καταγωγής, όπως αξιολογούνται από το ερωτηματολόγιο. Η έρευνα διεξήχθη σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι, που συντάχθηκε από την Παγκόσμια Ιατρική Ένωση (WMA) και εγκρίθηκε από τα Επιστημονικά Συμβούλια των συμμετεχόντων νοσοκομείων. Γραπτή συγκατάθεση δόθηκε από κάθε άτομο ή το συνοδεύοντα συγγενή, στην περίπτωση των ασθενών από τους οποίους η συναίνεση δεν ισχύει νομικά (π.χ. παιδιά).

## B1.2. Εργαστηριακός Εξοπλισμός

Για την εκτέλεση των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε εργαστηριακός εξοπλισμός εξολοκλήρου διαθέσιμος από το Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τα χαρακτηριστικά του οποίου αναγράφονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 8. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ. Καταλόγου	Προέλευση
<b>Βαθμονομημένη πιπέτα 0,2-2μL</b>	0,2-2μL pipette, sterile	F144801	GilsonInc, USA
<b>Βαθμονομημένη πιπέτα 1-10μL</b>	1-10μL pipette, sterile	F144802	GilsonInc, USA
<b>Βαθμονομημένη πιπέτα 2-20μL</b>	2-20μL pipette, sterile	F123600	GilsonInc, USA
<b>Βαθμονομημένη πιπέτα 20-100μL</b>	20-100μL pipette, sterile	F123615	GilsonInc, USA
<b>Βαθμονομημένη πιπέτα 50-200μL</b>	50-200μL pipette, sterile	F123601	GilsonInc, USA
<b>Βαθμονομημένη πιπέτα 200-1000μL</b>	200-1000μL pipette, sterile	F123602	GilsonInc, USA

### B1.3. Αναλώσιμα Αντιδραστήρια

Στο σύνολο των διεργασιών που συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και αναλώσιμα υλικά, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους Πίνακες 9 και 10, αντίστοιχα.

Πίνακας 9. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Αιθανόλη 100%	AbsoluteEthanol	ET0016	Scharlau, Spain
Αποστειρωμένο νερό	Waterforinjection	-	DEMOS.A, Greece
Αγαρόζη	Agarose	16500-500	Invitrogen, UK
Βρωμιούχοαιθίδιο	EthidiumBromide, 10 mg/mL	15585-011	BioRad, USA
Διάλυμα TBE	TBE 10x buffer	15581-028	Invitrogen,UK
Διάλυμα ρυθμιστικό χωρίς MgCl <sub>2</sub>	PCR Run Buffer 10x (-MgCl <sub>2</sub> )	Y02028	Invitrogen, UK
Διάλυμα ρυθμιστικό με MgCl <sub>2</sub>	50Mm MgCl <sub>2</sub>	Y02016	Invitrogen, UK
Μάρτυρας DNA	E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder	12373-031	Invitrogen, UK
Χρωστική	10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer	10816-015	Invitrogen, UK
Νερό ελεύθερο Rηασών	UltraPureWater	10977-015	Gibco, USA
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dNTPset	10297-018	Invitrogen, UK
Μάρτυρας DNA	100bp DNALadder	15622805	Invitrogen, UK
Περιοστικήενδονουκλεάση BsaHI	BsaHIRestrictionEnz yme		NewEnglandBiolab s, USA
ΠεριοστικήενδονουκλεάσηAclI	AclI RestrictionEnzyme		NewEnglandBiolab s, USA
ΠολυμεράσηTaq	TaqDNAPolymerase	18038-042	Invitrogen, UK
Kit εκχύλισης DNA	QiAamp DNA Blood Mini Kit	51104	Qiagen, Germany
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	QiAquickPCRPurifica tionKit	28106	Qiagen, Germany

Πίνακας 10: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Κυβέτεςφωτομέτρου	Uvette 220-1600 nm	9520010051	Eppendorf, UK
Ρύγχη πιπέτας 10 µL	10 µLsterilisedlongtips	DL10ST	GilsonInc, USA
Ρύγχη πιπέτας 100 µL, με φίλτρο	100 µLsterilisedfiltertips	DF100ST	GilsonInc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000 µL	1000 µLsterilisedfiltertips	DF1000ST	GilsonInc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 µL	200 µLsterilisedtips	D200ST	GilsonInc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 µL, με φίλτρο	200 µLsterilisedfiltertips	DF200ST	GilsonInc, USA
Ρύγχη πιπέτας 30 µL, με φίλτρο	30 µLsterilisedfiltertips	DF30ST	GilsonInc, USA
Σωληνάρια γενικής αίματος	VACUETTE® EDTAtubes	454087	Vacurette, USA
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	6571	Corning, USA
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	6571	Corning, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 15 mL	15 mLcentrifuge tubes- sterile,	430791	Corning, USA
Sterile Disposable Scalpel	ShangaiMedexInternationa l	GRF-2980	MedExSupply, USA

## B2. Μεθοδολογία και Γενικές Αρχές

### B2.1. Απομόνωση Γενωμικού DNA

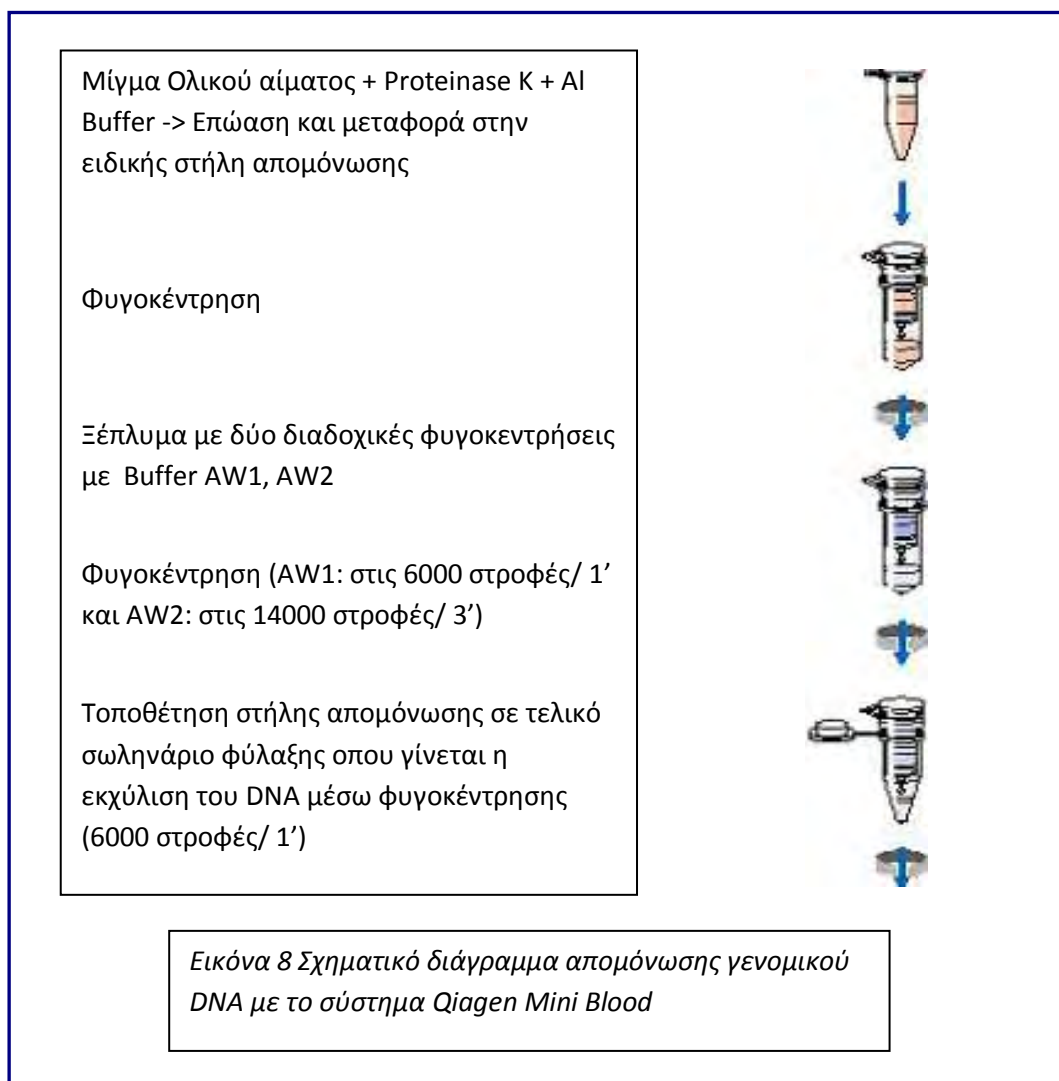
Το DNA που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε από δείγμα περιφερικού αίματος των ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το αίμα συλλέχθηκε σε φιαλίδια, παρουσία παράγοντα ο οποίος εμποδίζει την πήξη του αίματος. Η απομόνωση του DNA έγινε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου kit (QIAmp DNA Blood Mini Kit) της εταιρείας QIAGEN (GmbH, Hilden, Germany).

Αρχικά, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων στα οποία προστίθεται πρωτεϊνάση K και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (AL buffer). Το μίγμα επωάζεται στους 56°C για 20'-2 ώρες, και στη συνέχεια με προσθήκη αιθανόλης (96-100%) γίνεται κατακρήμνιση του DNA

με όλο το διάλυμα να μεταφέρεται σε ειδικές στήλες απομόνωσης DNA, όπου ακολουθείται το πρωτόκολλο απομόνωσης που παρέχεται από τον κατασκευαστή.

Στην συνέχεια, το DNA που έχει αναμιχθεί με αιθανόλη προσδένεται στη μεμβράνη QIAmp, ενώ τα άχρηστα προϊόντα από τη λύση των κυττάρων (πρωτεΐνες, RNA και φωσφολιπίδια) απομακρύνονται με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων έκπλυσης. Το DNA εκχυλίζεται από την μεμβράνη μέσα σε BufferAE το οποίο δεν έχει DNAσες και RNAσες, που θα μπορούσαν να κατακερματίσουν τα νουκλεϊκά οξέα.

Χρησιμοποιώντας αυτή την μέθοδο, απομονώνεται ολικό DNA περίπου 6μg από 200μl περιφερικού αίματος. Η συγκέντρωση του DNA ήταν περίπου 50-200 ng/μL. Τα δείγματα DNA μπορούσαν να διατηρηθούν στους 2-8°C για λίγες μέρες ή κατά προτίμηση σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως στην δική μας περίπτωση.



## B2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction PCR) είναι μια μέθοδος με πολύ μεγάλη εφαρμογή στη διάγνωση των γενετικών νοσημάτων. Επιτρέπει την ενζυμική σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα γενομικό DNA (Mullis et.al, 1987). Τα άκρα του τμήματος που πολλαπλασιάζεται οριοθετούνται με την επιλογή δύο ολιγονουκλεοτιδίων που λειτουργούν σαν εκκινητές (Saiki et.al, 1988). Στην αντίδραση λαμβάνει χώρα πολυμερισμός (επέκταση των εκκινητών) με DNA πολυμεράση που είναι σε θέση να συνθέσει συμπληρωματική έλικα DNA με κατεύθυνση 5' → 3'.

Η αντίδραση γίνεται σε ένα μικρό σωληνάριο σε όγκο συνήθως 20-50μl, και χρειάζεται δεσοξυριβοτριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) και ειδικό διάλυμα με χλωριούχο μαγνήσιο καθώς και ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στο οποίο υπάρχουν όλα τα χημικά αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία της πολυμεράσης.

Η αντίδραση PCR περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

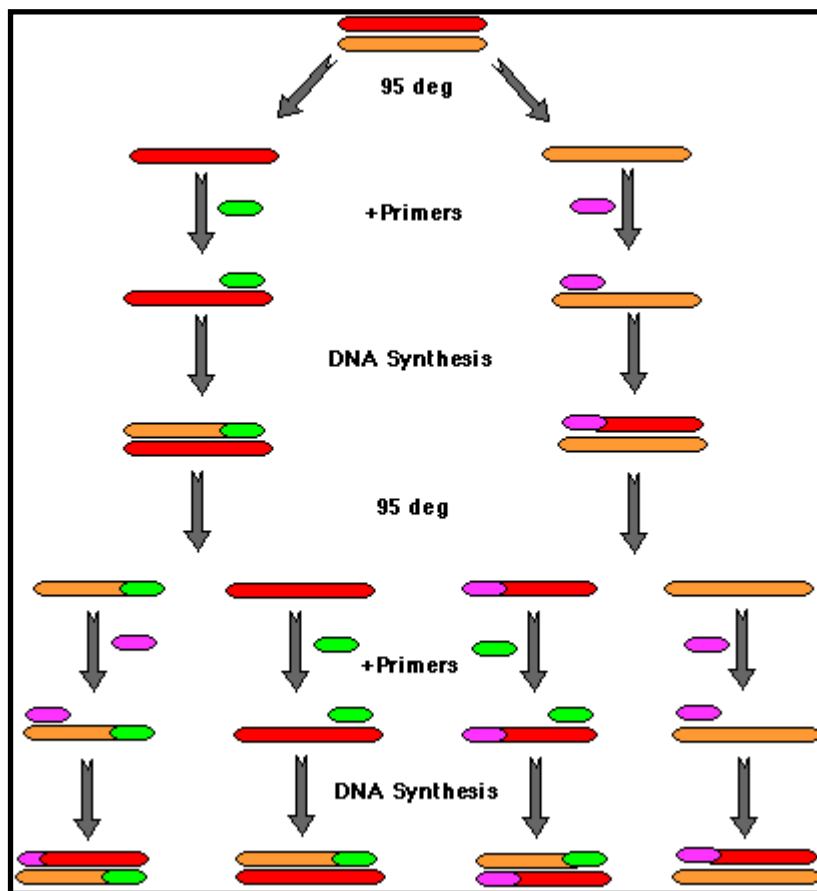
**1. Αποδιάταξη του υποστρώματος DNA** (template denaturation) σε υψηλή θερμοκρασία 94-96° C για διάρκεια περίπου ένα λεπτό.

**2. Σύνδεση των εκκινητών** με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες που βρίσκονται στις απέναντι αλυσίδες του DNA (annealing), σε θερμοκρασία μεταξύ 37-70° C για ένα λεπτό. Η ιδανική αντίδραση έχει θερμοκρασία annealing στο υψηλότερο δυνατό σημείο ώστε να μην υπάρχει μη ειδική σύνδεση των εκκινητών στο υπόστρωμα του DNA.

**3.Επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών** (primer extension). Η αντίδραση γίνεται σε θερμοκρασία συνήθως 72° C για ένα λεπτό.

Ο ακριβής χρόνος της επιμήκυνσης καθορίζεται από το μέγεθος του προϊόντος που θέλουμε να προκύψει και από την ποσότητα του αρχικού DNA. (εικόνα 9)

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.



Εικόνα 9. Σχηματικό διάγραμμα των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Στην συγκεκριμένη πειραματική εργασία, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας εκκινητές για τα γονίδια *BDKRB1*, *FXII*. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, που αντλήθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία, αποσκοπούσαν στην ενίσχυση των συγκεκριμένων αναγνωστικών πλαισίων, όπου εδράζονται οι πολυμορφισμοί που μας ενδιαφέρουν.



Πίνακας 11. Στοιχεία των ζεύγων εκκινητών, πρόσθιος (F) και οπίσθιος(R).

Γονίδιο	Αλληλουχία	Μήκος (bp) προϊόντος PCR
<b>BDKRB1</b> (Bachvaron 1998) <sup>138</sup>	Forward primer:5'-Agg gAACACAAGCAAAA gC-3' (20bp) Reverse primer: 5'-CCA ACT gAAGgC CCC TTA C-3' (19bp)	191bp
<b>FXII</b> (Zito 2000) <sup>153</sup>	Forward primer: 5'-TgA TAgCgA CCC CCCAgA AC-3' (20bp) Reverse primer: 5'-gAT AggCAGCTggACCAA Cg-3' (20bp)	142bp

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενομικούDNA που ενισχύθηκαν σε αντίδραση PCR 30 µl. Στην αντίδραση PCR για το γονίδιο του *FXII* προστέθηκε επιπλέον και DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) γιατί το ποσοστό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων G-C είναι μεγαλύτερο από 60% και η παρουσία αυτής της ένωσης βοηθά στην καλύτερη αποδιάταξη των δύο αλυσίδων DNA της διπλής έλικας.

Ετοιμάστηκε ένα κύριο μείγμα και ένα μείγμα Ταq πολυμεράσης με τα εξής συστατικά:

Πίνακας 12. Υλικά κύριου μείγματος για το γονίδιο του *FXII*

Αντιδραστήριο	Όγκος
H <sub>2</sub> O	242,5 µl
10xPCRBuffer	50 µl
dNTPs(2.5mM)	40 µl
MgCl <sub>2</sub> (100mM)	7,5 µl
PrimerF (50 pmol/µl)	10 µl
PrimerR (50pmol/µl)	10 µl

Πίνακας 13. Υλικά κύριου μείγματος για το γονίδιο του *BDKRB1*

Αντιδραστήριο	Όγκος
H <sub>2</sub> O	199,3 µl
10x PCRBuffer	50 µl
dNTPs (2.5mM)	40 µl
MgCl <sub>2</sub> (100mM)	7,5 µl
PrimerF (50 pmol/µl)	10 µl
PrimerR (50pmol/µl)	10 µl
DMSO	43,2

Πίνακας 14. Υλικά μείγματος Taq πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος
H <sub>2</sub> O	50 μl
Taq	2,2 μl

Για κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε ένα φιαλίδιο: 22 μl από το κύριο μείγμα, 6 μl από το μείγμα Taq πολυμεράσης και 2 μl DNA του δείγματος, ενώ χρησιμοποιήθηκε ένα τυφλό δείγμα για κάθε αντίδραση, για να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπήρχε επιμόλυνση.

Στον Πίνακα 15 παρατίθενται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε σωληνάρια της Corning (CorningCat 6571) και σε θερμοκυκλοποιητές Robo-cycler Gradient 96 Stratagene. Τα προϊόντα PCR διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% και φωτογραφήθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Πίνακας 15. Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

		Πολυμορφισμοί			
		5046T>C		697G>C	
Στάδιο		Θερμοκρασία	Διάρκεια	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (Firstdenaturation)	αποδιάταξη	94°C	2min	94°C	2min
Αποδιάταξη (Denaturation)		94°C	30sec	94°C	45sec
Υβριδισμός (Annealing)		55°C	30sec	60°C	45sec
Επέκταση (Extension)		72°C	30sec	72°C	45sec
Τελική επέκταση (FinalExtension)		72°C	5min	72°C	5min
Κύκλοι		34		38	

### B2.3. Πέψη με Ένζυμα Περιορισμού

Η μελέτη των πολυμορφισμών 5046T>C-FXII (rs1801020) και του 697G>C-BDKRB1 (rs4905475), πραγματοποιήθηκε έπειτα από πέψη των προϊόντων PCR με ένζυμα περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms-RFLP), το BsaHI και το AclI αντίστοιχα (κατασκευαστής NewEnglandbiolabs).

*FXII: πέψη με BsaHI*

Το ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία:

5'...GRCGYC...3'  
▼

3'...CYGCRG...5'  
▲

Ετοιμάστηκε το μείγμα πέψης σύμφωνα με τον πίνακα 16

Πίνακας 16

Αντιδραστήριο	Όγκος
dH <sub>2</sub> O	145μl
10x NEBuffer 4	30μl
<b>BsaHI ενζυμο (10U/μl)</b>	10μl

Για την πέψη 6μl του προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκαν 9μl του μείγματος πέψης, Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η επώαση του μείγματος σε υδατόλουτρο στους 37°C για τουλάχιστον 16 ώρες.

Ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2,5-3,0%. Αναλυτικά, επί παρουσίας της μετάλλαξης, ανιχνεύονται δύο δέσμες προϊόντων PCR στα 116 και 16bp μετά την ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος που προκύπτει από το αρχικό προϊόν. Σε περίπτωση ομοζυγωτίας παρατηρείται μία δέσμη στα 142bp καθώς το ένζυμο δεν κόβει την αλληλουχία. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται μετά την ηλεκτροφόρηση τρεις δέσμες στις 142, 116 και 16bp. Ως θετικοί μάρτυρες της πέψης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία είχε επιβεβαιωθεί η απουσία του πολυμορφισμού με την τεχνική ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.

*BDKRB1: πέψη με AclI*

Το ένζυμο αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία:

5'...CCGC...3'  
▼

3'...GGCG...5'  
▲

Ετοιμάστηκε το μείγμα πέψης σύμφωνα με τον πίνακα 17

Πίνακας 17

Αντιδραστήριο	Όγκος
dH <sub>2</sub> O	145μl
10x NEBuffer 3	30μl
Acil ενζυμο (10U/μl)	10μl

Για την πέψη 6μl του προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκαν 9μl του μείγματος πέψης, Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η επώαση του μείγματος σε υδατόλουτρο στους 37°C για μία ώρα.

Ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 2,5-3,0%. Αναλυτικά, επί απουσίας της μετάλλαξης, ανιχνεύεται μία δέσμη προϊόντων PCR στα 191bp μετά την ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος. Σε περίπτωση ομοζυγωτίας δημιουργείται μια νέα θέση πέψης και παρατηρούνται δύο δέσμες στις 134 και 57bp. Σε ετεροζυγώτες φορείς του πολυμορφισμού ανιχνεύονται μετά την ηλεκτροφόρηση τρεις δέσμες στις 191, 134 και 57bp. Ως θετικοί μάρτυρες της πέψης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα στα οποία είχε επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του πολυμορφισμού με την τεχνική ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.

## B2.4. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) καθώς και ο διαχωρισμός των προϊόντων πέψης έγιναν ορατοί με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2,5 με 3%, επί παρουσίας ρυθμιστικού διαλύματος 1xTBE.

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που εκμεταλλεύεται το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων του DNA, έτσι ώστε όταν αυτό τοποθετηθεί εντός ηλεκτρικού πεδίου να κινηθεί προς τον θετικό πόλο. Συγκεκριμένα, το DNA τοποθετείται σε γέλη η οποία τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου το DNA θα κινηθεί κατά τον αρνητικό πόλο με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους του, και εξαρτώμενη επίσης από το μέγεθος των πόρων της γέλης. Έτσι σε ένα μείγμα με διάφορα τμήματα DNA, τα μικρότερα τμήματα θα κινούνται γρηγορότερα προς τον θετικό πόλο, ενώ τα μεγαλύτερα θα κινούνται πιο αργά. Μπορούμε έτσι να διαχωρίσουμε τα διάφορα

τμήματα DNA, και παράλληλα χρησιμοποιώντας έναν μάρτυρα με τμήματα DNA γνωστού μεγέθους να γνωρίζουμε το μέγεθος του κάθε τμήματος που διαχωρίστηκε.

Στο πήκτωμα προστέθηκε επιπλέον διάλυμα βρομιούχου αιθιδίου τελικής συγκέντρωσης 0,5 ng/ml, το οποίο αποτέλεσε την φθορίζουσα χρωστική. Το βρομιούχο αιθίδιο έχει τη δυνατότητα να διεισδύει ανάμεσα στις βάσεις του DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Σε κάθε ένα από τα δείγματα προστέθηκε ειδική χρωστική (loading dye) σε αναλογία 1/10 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (10μL δείγματος, 1μL χρωστική), έτσι ώστε να διακρίνεται η μετακίνηση τους στο πήκτωμα. Στη συνέχεια το κάθε μείγμα τοποθετήθηκε στο πήκτωμα και μετακινούνται από 50 έως 70 λεπτά στα 120 V και 400 mA. Για τον υπολογισμό του μεγέθους, τόσο των προϊόντων PCR όσο και προϊόντων πέψης, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ο E-GelLowRangeLadder (100-2000 ζεύγη βάσεων). Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gelcapture' (DNRBioimagingSystems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap.

## **B2.5. Καθαρισμός των προϊόντων PCR προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων**

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, σχετικά με την παρουσία των γενετικών παραλλαγών που μελετήθηκαν, έγινε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing), κατόπιν καθαρισμού των PCR προϊόντων, σε αρκετά από τα δείγματα. Χρησιμοποιήθηκαν τυχαία αλλά και επιλεγμένα δείγματα, τόσο θετικά, ως προς την παρουσία των εν λόγω πολυμορφισμών, όσο και αρνητικά. Πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη αλληλούχηση με τη χρήση του BigDyeTerminatorDNAsequencingkit (AppliedBiosystems) και του γενετικού αναλυτή αλληλουχίας βάσεων ABIPrism 7100 (AppliedBiosystems, FosterCity, CA).

Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του PureLinkPCRPurificationkit (Invitrogen, Cat.No. K3100-01), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινητών, νουκλεοτιδίων, πολυμεράσης και αλάτων, προκειμένου τα προϊόντα να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για ανάλυση αλληλουχίας βάσεων.

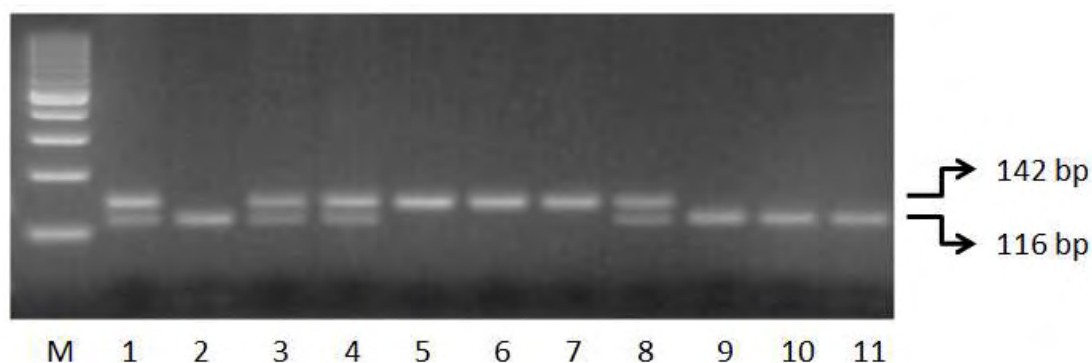
Αναλυτικότερα: Προστέθηκαν 4 όγκοι BindingBuffer (B2), αναμειγνύουμε και το μεταφέρουμε στις ειδικές στήλες PureLinkSpin οι οποίες περιέχουν μεμβράνη, έτσι ώστε να γίνει προσρόφηση του DNA μέσω του διαλύματος PBI, το οποίο εξασφαλίζει την

απαιτούμενη συγκέντρωση αλάτων και pH. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 1 λεπτό και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια, ακολούθησε εκπλύση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει αιθανόλη (Whasingbuffer) και φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 1 λεπτό. Ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 10000 στροφές για 3 λεπτά, χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν αιθανόλης από τα τοιχώματα της στήλης. Τέλος, η στήλη τοποθετήθηκε σε σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1,5mL, προστέθηκαν 30 μL διαλύματος εκχύλισης (E1buffer), παρέμεινε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιήθηκε τελική φυγοκέντρηση στα 13000 στροφές για 2 λεπτό. Για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητας των προϊόντων PCR που απομονώθηκαν, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, με μεθοδολογία που περιγράφηκε αναλυτικά παραπάνω. Το καθαρισμένο δείγμα DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την πραγματοποίηση της ανάλυσης της αλληλουχίας του.

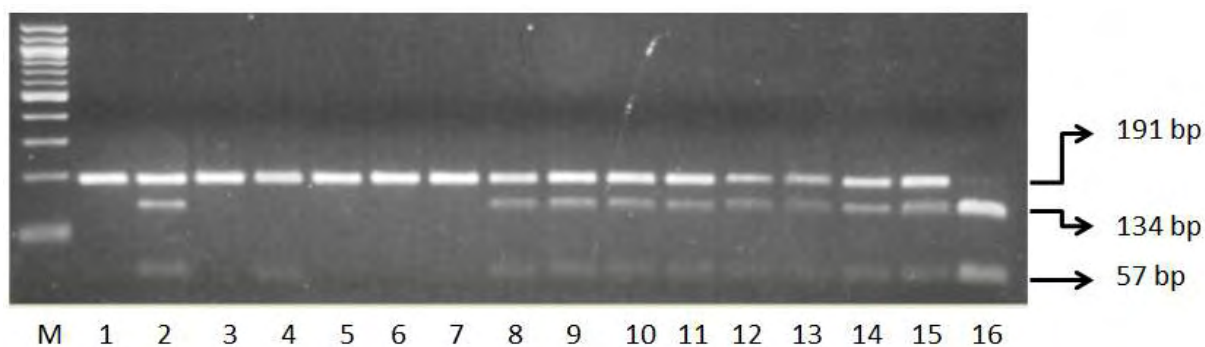
## Γ. Αποτελέσματα

### Γ1. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης των προϊόντων πέψης

Στις εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης μετά από PCR-RFLP για την ανίχνευση των παραλλαγών που μελετήθηκαν αλλά και ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

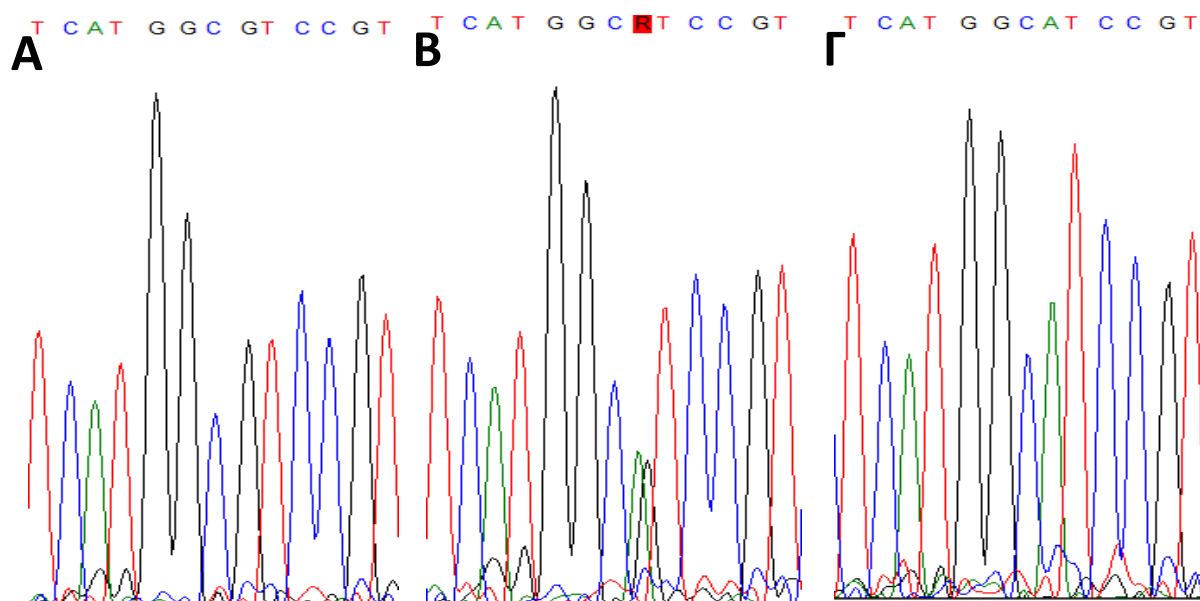


**Εικόνα 10.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με PCR-RFLP, για την ανίχνευση του C46T πολυμορφισμού του γονιδίου FXII. M: μάρτυρας. Δείγματα 2, 9, 10, 11 wt, δείγματα ομόζυγα 5, 6, 7, δείγματα 1, 3, 4 ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό C46T. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αγαρόζης 3%.

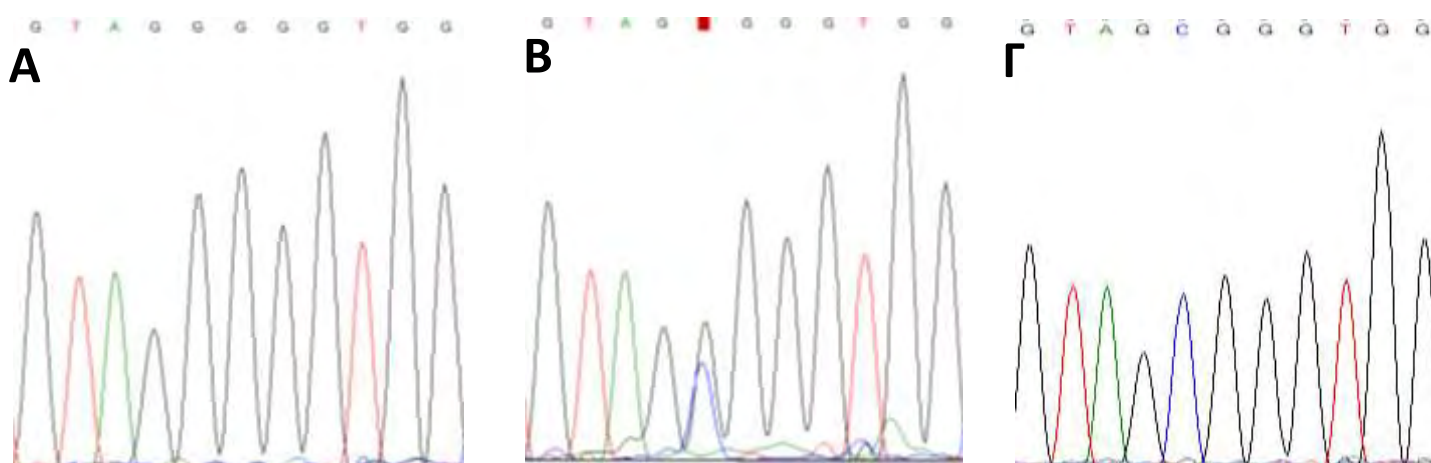


**Εικόνα 11.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα πέψης με PCR-RFLP, για την ανίχνευση του αλληλόμορφο -699G>C πολυμορφισμού του γονιδίου BDKRB1. M: μάρτυρας. Δείγματα 1, 3, 4, 5, 6, 7 wt, δείγμα 16 ομόζυγο, δείγματα 2, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό -699G>C. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πηκτή αγαρόζης 3%.

## Γ2. Αλληλούχιση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης



**Εικόνα 12.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων, στην περιοχή του υποκινητή στο γονίδιο *FXII*. Η αλληλούχιση έχει γίνει με τον αντίστροφο εκκινητή. Α. Δείγμα με γονότυπο άγριου τύπου. Β. Δείγμα με γονότυπο ετερόζυγο για τον πολυμορφισμό. Γ. Δείγμα με γονότυπο ομόζυγο για τον πολυμορφισμό.



**Εικόνα 13.** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ανάλυσης αλληλουχίας βάσεων, στην περιοχή του υποκινητή στο γονίδιο *BDKRB1*. Α. Δείγμα με γονότυπο άγριου τύπου. Β. Δείγμα με γονότυπο ετερόζυγο για τον πολυμορφισμό. Γ. Δείγμα με γονότυπο ομόζυγο για τον πολυμορφισμό.



### Γ3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν ως διάμεσος (εύρος τιμών), ενώ οι μεταβλητές κατηγορίες ως απόλυτη τιμή ή ποσοστά. Οι συγκρίσεις όσον αφορά τη συχνότητα ανάμεσα σε μεταβλητές κατηγορίες πραγματοποιήθηκαν με τον έλεγχο  $\chi^2$ , Spearman Correlation και logistic regression, ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος αναλογιών (odds ratio, OR) με το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (confidence interval, CI). Οι συγκρίσεις ανάμεσα σε κατηγορικές και συνεχείς μεταβλητές έγιναν με Mann-Whitney U- test μη παραμετρικό έλεγχο και Logistic Regression . Όλοι οι έλεγχοι θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικοί, σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$ .

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συχνότητα των πολυμορφισμών C46T και -699G>C των γονιδίου *FXII* και *BDKRB1* αντίστοιχα και καθώς και οι διαφορές που προκύπτουν κατά τη στατιστική δοκιμασία  $\chi^2$  σε ασθενείς.

#### Γ3.1. Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό *FXII*-C46T

Από τους ασθενείς με ΚΑΟ 30 ήταν ετερόζυγοι φορείς του πολυμορφισμού και 6 παρουσίασαν σε ομόζυγη κατάσταση το αλληλόμορφο του πολυμορφισμού *FXII*-C46T. Η ομάδα των ασθενών βρίσκεται σε ισοροπία Hardy-Weinberg [ $p = 0.161$ ]. Στην ομάδα μαρτύρων είχαμε 38 ετερόζυγα και 1 ομόζυγο άτομο για τον πολυμορφισμό του *FXII* και βρίσκεται επίσης σε ισοροπία Hardy-Weinberg [ $p = 0.063$ ]. Η συχνότητα του αλληλομόρφου συμφωνεί με την βιβλιογραφία. Κατά τη σύγκριση της συχνότητας επίπτωσης του πολυμορφισμού *FXII*-C46T φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των υγιών μαρτύρων [ $p = 0.180$ ,  $\chi^2$  test] (Πίνακας 18).

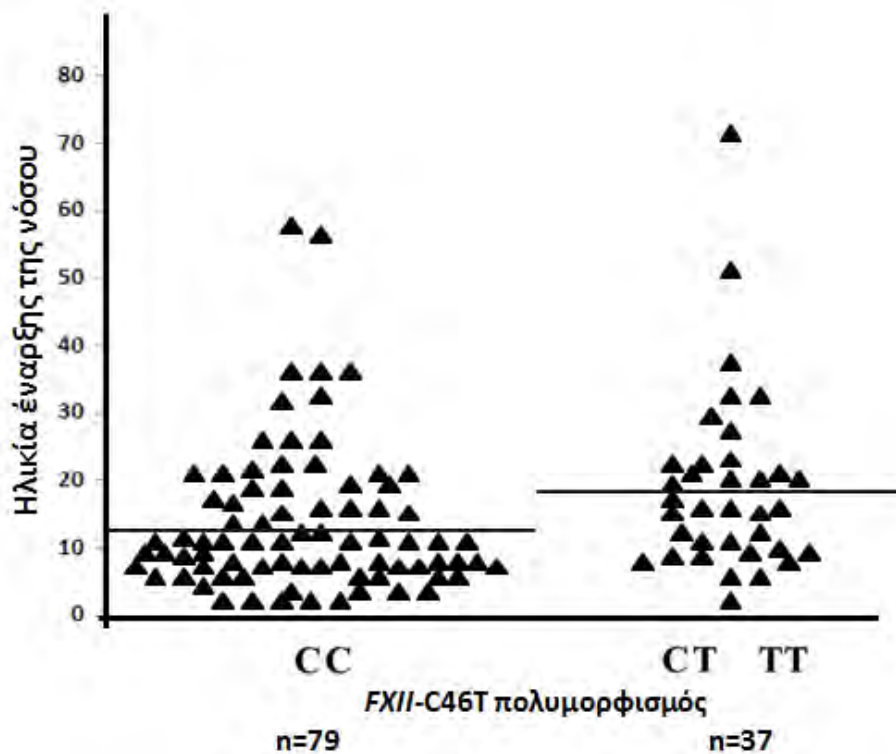
Πίνακας 18. Τα αποτελέσματα της συχνότητα αλληλομόρφου του πολυμορφισμού *FXII-C46T*, σε ασθενείς με ΚΑΟ και σε φυσιολογικούς μάρτυρες

	Άτομα με ΚΑΟ Συνολικά (n=123)	Γερμανοί (ΚΑΟ) (n=28)	Ρουμάνοι (ΚΑΟ) (n=20)	Έλληνες (ΚΑΟ) (n=75)
Ομόζυγοι (T/T)	6	5	1	0
Ετερόζυγοι (C/T)	31	7	5	19
Συχνότητα T αλληλομόρφου	17,4%	30,4%	17,5%	12,7%

Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=101)	
Ομόζυγοι (T/T)	1
Ετερόζυγοι (C/T)	38
Συχνότητα T αλληλομόρφου	19.8%

Για τα οιδήματα λάρυγγα και τα οιδήματα κοιλίας η διαφορά μεταξύ των γονοτύπων του πολυμορφισμού του γονιδίου *FXII* δεν είναι στατιστικά σημαντική, δηλαδή η εκδήλωση οιδημάτων λάρυγγα και κοιλίας δεν σχετίζεται με τον γονότυπο του ασθενούς [ $p= 0.192$  και  $p= 0.135$  αντίστοιχα Fisher's exact test]. Επίσης δεν βρέθηκε και καμία συσχέτιση του γονότυπου με την ανάγκη μακράς διάρκειας προφυλακτικής θεραπείας [ $p= 0.112$ , Fisher's exact test].

Ωστόσο, βρέθηκε συσχέτιση του γονότυπου του *FXII* με την ηλικία έναρξης της νόσου που είναι ο σημαντικότερος γνωστός προγνωστικός δείκτης της νόσου. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι άτομα με γονότυπο CC εμφανίζουν πιο νωρίς τη νόσο. [ $p= 0.007$ , Mann-Whitney U- test] (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Σχέση του γονότυπου του FXII με την ηλικία έναρξης της νόσου.

Επίσης, όσον αφορά τη σχέση του πολυμορφισμού με την ηλικία έναρξης κάναμε 2 κατηγοριοποιήσεις. Ανάλογα με το αν εμφάνισαν πρώτη φορά συμπτώματα πριν ή μετά την ηλικία των 12 ετών καθώς και πριν και μετά τα 14 έτη. Η διχοτόμος ορίστηκε στα 12 έτη γιατί το 75% των ασθενών εμφανίζουν συμπτώματα πριν από αυτή την ηλικία.<sup>51</sup> Βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες και στις δύο κατηγοριοποιήσεις επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα [ $p=0.017$ ,  $p=0,008$ ,  $\chi^2$  test].

Όπως προαναφέρθηκε το ΚΑΟ οφείλεται σε ανεπάρκεια του C1INH λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1*. Ταξινομήσαμε τις μεταλλάξεις των ασθενών σε 6 κατηγορίες: παρερμηνεύσιμες, ανερμηνεύσιμες, αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης, λανθασμένου ματίσματος, μεγάλης εισαγωγής-έλλειψης βάσεων, ρυθμιστικές (υποκατάσταση του πρώτου αμινοξέως της πρωτεΐνης) και απουσία μετάλλαξης. Δεν βρέθηκε συσχέτιση του είδους της μετάλλαξης με τον πολυμορφισμό του γονιδίου *FXII* [ $r=-0.087$ ,  $p=0.338$  Spearman Correlation- $\chi^2$  test]]. Επίσης, κατηγοριοποιήσαμε τις μεταλλάξεις, βασιζόμενοι στη πρόσφατη βιβλιογραφία,<sup>10</sup> σε παρερμηνεύσιμες και σε μη παρερμηνεύσιμες, και δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση [ $p=0.096$ , Fisher's exact test] (Πινάκας 19).

Πίνακας 19. Ποσοστά των ειδών των μεταλλάξεων στο γονίδιο του *SERPING1* που φέρουν οι ασθενείς

Είδος μεταλλάξεων του <i>SERPING1</i>	N, %
Παρερμηνεύσιμες	40, 32.5
Ανερμηνεύσιμες	17, 13.8
Αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης	30, 24.4
Λανθασμένου ματίσματος	17, 13.8
Μεγάλη εισαγωγή-έλλειψη βάσεων	7, 6.0
Ρυθμιστικές	5, 4.0
Απουσία μετάλλαξης	5, 4.0

Είδος μεταλλάξεων του <i>SERPING1</i>	N, %
Παρερμηνεύσιμες	40, 32.5
Ανερμηνεύσιμες	83, 67.8

### Γ3.2. Στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό *BDKRB1*-(-699G>C)

Από τους ασθενείς με ΚΑΟ 17 ήταν ετερόζυγοι φορείς και 1 παρουσίασε σε ομόζυγη κατάσταση το αλληλόμορφο του πολυμορφισμού *BDKRB1*-(-699G>C). Ο πληθυσμός των ασθενών βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [ $p=0.521$ ]. Στην ομάδα μαρτύρων είχαμε επίσης 13 ετερόζυγα και 1 ομόζυγο άτομο όσο αφορά τον πολυμορφισμό του γονιδίου *BDKRB1*. Η ομάδα των ασθενών επίσης βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg [ $p=0.521$ ]. Η συχνότητα του αλληλομόρφου είναι λίγο μικρότερη από αυτή που αναφέρεται στην βιβλιογραφία αλλά πρέπει να τονιστεί ότι δεν έχει μελετηθεί ποτέ σε μεγάλο δείγμα για να είναι αξιόπιστη η συχνότητα. Κατά τη σύγκριση της συχνότητας επίπτωσης του πολυμορφισμού φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των υγιών μαρτύρων [ $p= 0.869$ ,  $\chi^2$  test] (Πίνακας 19).

Πίνακας 20. Τα αποτελέσματα της συχνότητας αλληλομόρφου του πολυμορφισμού *BDKRB1*-(699G>C), σε ασθενείς με ΚΑΟ

	Άτομα με ΚΑΟ Συνολικά (n=123)	Γερμανοί (ΚΑΟ) (n=28)	Ρουμάνοι (ΚΑΟ) (n=20)	Έλληνες (ΚΑΟ) (n=75)
Ομόζυγοι (C/C)	1	0	1	0
Ετερόζυγοι (G/C)	17	4	4	9
Συχνότητα C αλληλομόρφου	7,7%	7,1%	15%	6%

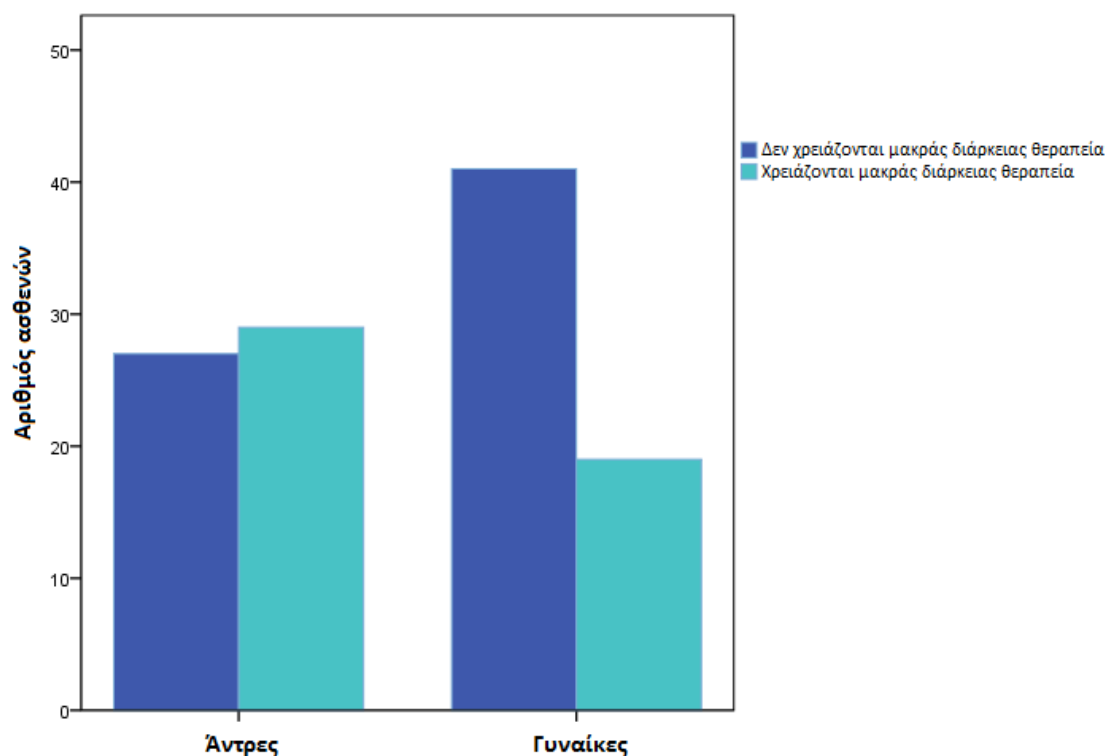
Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=101)	
Ομόζυγοι (C/C)	1
Ετερόζυγοι (G/C)	13
Συχνότητα C αλληλομόρφου	7,6%

Ο πολυμορφισμός δεν επηρεάζει την κλινική εκδήλωση της νόσου στο παρόν υλικό. Συγκεκριμένα δεν έχουμε καμία στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό - 699G>C και την εντόπιση των οιδημάτων λάρυγγα [ $p= 0.906$ ] ή κοιλιάς [ $p=0.491$ ] και τη λήψη μακράς διάρκειας θεραπείας [ $p= 0.998$ ] σύμφωνα με το Logistic Regression. Επίσης καμία στατιστικά σημαντική διάφορα δεν βρέθηκε και με το Fisher's exact test [ $p= 0.945$ ,  $p=0.190$   $p= 0.815$ , αντίστοιχα]. Επίσης, δεν βρέθηκε συσχέτιση και με την ηλικία έναρξης της νόσου [ $p= 0.351$ , Mann-Whitney U- test].

Για την σχέση μεταξύ της ηλικίας έναρξης του ΚΑΟ και του γονοτύπου του *BDKRB1* κάναμε επίσης τις δύο κατηγοριοποιήσεις, πριν και μετά την ηλικία των 12 ετών και πριν και μετά τα 14 έτη. Αλλά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε στην πρώτη [ $p= 0.380$ ,  $\chi^2$  test,], ούτε στην δεύτερη περίπτωση [ $p= 0,599$ ,  $\chi^2$  test].

Επίσης, δεν βρέθηκε κάποια του παραπάνω πολυμορφισμού με το είδος της μετάλλαξης. Ούτε στην κατηγοριοποίηση σε παρερμηνεύσιμες, ανερμηνεύσιμες, αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης, λανθασμένου ματίσματος, μεγάλης εισαγωγής-έλλειψης βάσεων, ρυθμιστικές και απουσία μετάλλαξης [ $r= -0.037$ ,  $p= 0.681$  Spearman Correlation- $\chi^2$  test], ούτε στην κατηγοριοποίηση σε παρερμηνεύσιμες σε μη παρερμηνεύσιμες [ $p= 0.946$ , Fisher's exact test].

Τέλος, ανεξαρτήτως των πολυμορφισμών φαίνεται ότι οι άνδρες χρειάζονται συχνότερα μακράς διάρκειας θεραπεία αν και αυτό θεωρητικά μπορεί να οφείλεται στο ότι γενικά ανδρογόνα δεν χορηγούνται εύκολα σε γυναίκες τουλάχιστον για θεραπείες πολύ μεγάλης διάρκειας [ $r = -0.204$ ,  $p = 0.028$  Spearman Correlation- $\chi^2$  test](Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Γράφημα του αριθμού των αντρών και γυναικών που χρειάζονται μακράς διάρκειας θεραπεία.

Ωστόσο, από την ανάλυση προκύπτουν κάποια ενδιαφέροντα αποτελέσματα όσον αφορά το ΚΑΟ, που δεν συμφωνούν απόλυτα με τη βιβλιογραφία.<sup>154,45</sup> Η εντόπιση των κρίσεων στη κοιλιά επηρεάζεται από την ηλικία έναρξης [ $r = 0.194$ ,  $p = 0.038$ , Spearman Correlation- $\chi^2$  test.] Ενώ, οι κρίσεις στον λάρυγγα δεν φαίνεται να σχετίζονται με την ηλικία εμφάνισης των πρώτων συμπτωμάτων [ $r = -0.31$ ,  $p = 0.742$ ,  $\chi^2$  Spearman Correlation- $\chi^2$  test].<sup>155</sup> Επίσης, άτομα που εκδηλώνουν πρωϊμότερα τη νόσο (τόσο για τα άτομα με ηλικία μικρότερη των 12 ετών, όσο και για εκείνα κάτω των 14 ετών) δεν φαίνεται να χρειάζονται πιο συχνά μακράς διάρκειας θεραπεία [ $r = 0.421$ ,  $p = 0.255$  αντίστοιχα, Fisher's exact test].

## Δ. Συζήτηση

Όπως προαναφέραμε, η παθογένεση του ΚΑΟ οφείλεται ή σε έλλειψη ή σε μετάλλαξη της πρωτεΐνης C1-INH, ωστόσο οι κλινικές εκδηλώσεις και η βαρύτητα της νόσου δεν έχουν συσχετιστεί με το είδος της μετάλλαξης.<sup>156,157</sup> Ακόμα άτομα με ΚΑΟ, τα οποία ανήκουν στην ίδια οικογένεια και φέρουν την ίδια μετάλλαξη μπορεί να εμφανίζουν ετερογένεια στην ηλικία εμφάνισης της νόσου, στη σοβαρότητα και την ανταπόκριση στην θεραπεία. Η εικόνα των ασθενών μπορεί να είναι από ασυμπτωματική εικόνα (σπάνιες περιπτώσεις) αλλά μπορεί να παρουσιάζονται εβδομαδιαία επεισόδια.<sup>38</sup> Το είδος και η θέση της μετάλλαξης δίνουν πληροφορίες μόνο για τον τύπο του ΚΑΟ.<sup>148</sup>

Μια περιορισμένη συσχέτιση γονοτύπου-φαινοτύπου έχει περιγραφεί για ένα πολυμορφισμό που οδηγεί σε λανθασμένο μάτισμα και σχετίζεται με ηπιότερη πορεία της νόσου. Μία έρευνα έδειξε ότι ο πολυμορφισμός c . - 21t/c στο δεύτερο εξώνιο του γονιδίου *SERPING1*, όταν υπάρχει σε μη μεταλλαγμένο αλληλόμορφο , μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο σοβαρής μορφής της νόσου.<sup>152</sup> Μια παρόμοια παρατήρηση βρέθηκε και σε μία ακόμα οικογένεια από τους Duponchel *et al.*<sup>158</sup> Παρ 'όλα αυτά , αυτός ο πολυμορφισμός είναι σε μη κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου και είναι αρκετά σπάνιος με συχνότητα περίπου 8 % σε ετεροζυγώτες στο γενικό πληθυσμό και γι αυτό μπορεί να εξηγήσει έναν πιο σοβαρό φαινότυπο στη μειοψηφία των ασθενών με ΚΑΟ.<sup>159</sup> Επίσης, μόνο μία πρόσφατη έρευνα συνδέει τις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις με πιο ήπια κλινική εικόνα. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι οι φορείς αυτών των μεταλλάξεων έχουν μικρότερη συχνότητα κρίσεων και ελαττωμένη ανάγκη χρήσης παρασκευάσματος C1INH.<sup>10</sup> Έτσι, η χαμηλή συσχέτιση των μεταλλάξεων του υπεύθυνου γονιδίου με την κλινική εικόνα, υποδεικνύουν ότι υπάρχουν και άλλοι γενετικοί παράγοντες (γενετικοί και περιβαλλοντικοί) εκτός του γονιδίου αυτού, που πιθανόν επηρεάζουν τον φαινότυπο. Κατανοώντας όλους τους εμπλεκόμενους παράγοντες, ίσως προκύψουν καλύτερες εκτιμήσεις για την έκβαση της νόσου αλλά και τις θεραπευτικές μεθόδους.

Η έρευνα για παράγοντες που επηρεάζουν τις κλινικές εκδηλώσεις του ΚΑΟ όπως είναι οι πολυμορφισμοί γονιδίων πρωτεϊνών ενεργοποίησης του συστήματος συμπληρώματος και του συστήματος επαφής (έχουν μελετηθεί ελάχιστα και σε μικρή κλίμακα) μπορεί να δείξει κάποια συσχέτιση με την κλινική εκδήλωση της νόσου. Στο πλαίσιο αυτό μελετήσαμε τους πολυμορφισμούς των γονιδίων *FXII* και *BDKRB1*. Ο *FXII* υπόκειται σε μία αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του που οδηγεί στην αυτοενεργοποίησή του και στη συνέχεια επάγει την παραγωγή BK μέσω του συστήματος επαφής.<sup>160</sup> Επίσης, οι

υποδοχείς BK που είναι μεσολαβητές του οιδήματος, έχουν σημαντικό ρόλο στη παθογένεση του ΚΑΟ και άλλων ασθενειών.<sup>161</sup> Οι πολυμορφισμοί την επίδραση των οποίων μελετήσαμε είναι ο *FXII*-C46T και ο *BDKRB1*-(-699G>C).

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μία μελέτη και για τον πολυμορφισμό *BDKRB1*-(-699G>C). Οι Freiburger *et al* έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός δεν επηρεάζει τις κρίσεις οιδήματος λάρυγγα και κοιλιακής χώρας, τόσο τη σοβαρότητα όσο και την εντόπισή τους, καθώς και κανένα κλινικό χαρακτηριστικό. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι η μελέτη διεξήχθη σε έναν περιορισμένο αριθμό ετερογενών ασθενών (69 ασθενείς από 37 οικογένειες).<sup>148</sup>

Ο πολυμορφισμός *FXII*-C46T θεωρείται ο μοναδικός του γονιδίου του *FXII* που επηρεάζει τα επίπεδα του παράγοντα και έχει σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση BK.<sup>104</sup> Μελέτες δείχνουν ότι οι φορείς του C/C γονότυπος, εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα του *FXII*.<sup>162</sup> Σε μία πρόσφατη έρευνα διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού αυτού και της ηλικία της εμφάνισης των πρώτων συμπτωμάτων. Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν σε πολύ νεότερη ηλικία στους ομόζυγους φορείς του C αλληλόμορφου σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς.<sup>10</sup>

Σύμφωνα με άλλες μελέτες κατηγοριοποιήσαμε την ομάδα ελέγχου (άτομα με ΚΑΟ), εκτός από την εθνικότητα (Γερμανοί, Ρουμάνοι, Έλληνες) και σε κατηγορίες με βάση την ηλικία έναρξης (σημαντικός προγνωστικός δείκτης της νόσου), την ηλικία διάγνωσης, τις κρίσεις οιδήματος λάρυγγα και κοιλιακής χώρας και την μακροχρόνια προφύλαξη. Η ανάγκη λήψης μακράς διάρκειας αγωγής, είναι ενδεικτική της βαρύτητας της νόσου, δηλαδή λήψη της σημαίνει κατά κανόνα συχνές κρίσεις. Για να μελετήσουμε επίσης καλύτερα τα αποτελέσματα διακρίναμε δύο ηλικιακές ομάδες, μία πριν και μετά την ηλικία των 12 ετών καθώς και πριν και μετά τα 14 έτη. Επειδή το ΚΑΟ είναι ένα σπάνιο νόσημα και τα δείγματα προς ανάλυση είναι ιδιαίτερος δύσκολο να συλλεχτούν, ο αριθμός των δειγμάτων ήταν περιορισμένος. Από αυτά τα περισσότερα δείγματα είχαν οικογενειακό ιστορικό, ενώ επιπλέον 11 δεν έχουν εμφανίσει κλινικά συμπτώματα.

Αρχικά διαπιστώσαμε ότι η συχνότητα των πολυμορφισμών *FXII*-C46T και *BDKRB1*-(-699G>C) δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ατόμων με ΚΑΟ και των φυσιολογικών μαρτύρων.

Επίσης, διαπιστώθηκε ότι οι άνδρες χρειάζονται συχνότερα μακροχρόνια προφύλαξη. Ωστόσο αυτό θεωρητικά μπορεί να οφείλεται στο ότι γενικά (αν και όχι πάντα) ανδρογόνα τείνουμε να μη δίνουμε εύκολα σε γυναίκες (τουλάχιστον για θεραπείες πολύ μεγάλης διάρκειας. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η εντόπιση των κρίσεων στη κοιλιά επηρεάζεται



από την ηλικία έναρξης ενώ οι κρίσεις στον λάρυγγα δεν συσχετίζονται με την ηλικία που εμφανίζονται πρώτη φορά τα συμπτώματα. Τέλος, τα άτομα που εκδηλώνουν πρωϊμότερα τη νόσο δεν φαίνεται να χρειάζονται πιο συχνά μακράς διάρκειας θεραπεία, το οποίο έρχεται σε αντίθεση με την βιβλιογραφία.<sup>45,163</sup>

Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό *BDKRB1*-(-699G>C) και την κλινική εκδήλωση του ΚΑΟ. Πιο συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός δεν φαίνεται να συνδέεται με τα οιδήματα κοιλίας, λάρυγγα και τη λήψη μακροχρόνιας θεραπείας. Επίσης, δεν συσχετίζεται με την ηλικία έναρξης της νόσου στις κατηγοριοποιήσεις που κάναμε (πριν και μετά την ηλικία των 12 ετών και των 14 ετών). Επιπλέον ο πολυμορφισμός δεν συνδέεται με το είδος της γενετικής βλάβης του *SERPING1*.

Ο πολυμορφισμός *FXII*-C46T δεν φαίνεται να συσχετίζεται με τα οιδήματα του λάρυγγα, της κοιλίας και την ανάγκη για τη λήψη μακράς διάρκειας θεραπείας. Ακόμα, ο πολυμορφισμός δεν συνδέεται με το είδος της μετάλλαξης σε καμία από τις δύο κατηγοριοποιήσεις που κάναμε και δεν σχετίζεται με τα κλινικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στα μέλη οικογενειών που φέρουν την ίδια μετάλλαξη.

Το σημαντικότερο εύρημα που προέκυψε για τον πολυμορφισμό *FXII*-C46T, είναι ότι σχετίζεται με πιο όψιμη εμφάνιση της νόσου και πιο συγκεκριμένα είναι συχνότερος στην ομάδα που εμφάνισε τη νόσο τόσο μετά τα 12 έτη όσο και μετά τα 14 έτη. Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων όπως αναφέρθηκε, είναι ο σημαντικότερος προγνωστικός δείκτης της νόσου. Επίσης, τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με αυτά πρόσφατης μελέτης μεγάλης σειράς σε ουγγρικό πληθυσμό.<sup>10</sup> Έτσι, ο πολυμορφισμός φαίνεται να έχει προστατευτικό χαρακτήρα. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι οι φορείς του T αλληλομόρφου έχουν μειωμένα επίπεδα του FXII, συνεπώς επάγουν σε μικρότερο βαθμό την απελευθέρωση BK. Ο πολυμορφισμός φαίνεται να έχει αξία ως βιοδείκτης καθώς μπορεί να ταυτοποιείται μοριακά σε πάσχοντες ή ακόμα και σε συγγενείς πασχόντων που ακόμα δεν έχουν εμφανίσει τη νόσο και να δίνει πληροφορίες για την καλύτερη πρόγνωση και θεραπεία των ασθενών, η οποία κοστίζει ακριβά. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να διευκρινιστεί πως τα επίπεδα του FXII επηρεάζουν την ηλικία εμφάνισης της νόσου.

Συμπερασματικά, ο πολυμορφισμός *BDKRB1*-(-699G>C) δεν φαίνεται να επηρεάζει την κλινική εκδήλωση της νόσου τόσο στο δείγμα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη που περιλαμβάνει τρεις εθνικότητες (Έλληνες, Γερμανοί, Ρουμάνοι) όσο και σε μελέτη στον γερμανικό πληθυσμό.<sup>148</sup> Αντίθετα ο πολυμορφισμός *FXII*-C46T φαίνεται να έχει προγνωστική αξία. Καθώς συσχετίζεται ισχυρά με την ηλικία έναρξης της νόσου στο

παρόν υλικό (123 ασθενείς) και στο επίσης μεγάλο δείγμα ασθενών (99 ασθενείς) σε μελέτη στον ουγγρικό πληθυσμό.<sup>10</sup>

## Βιβλιογραφία

- <sup>1</sup> Rosen FS, Davis AE 3rd. Deficiencies of C1 inhibitor. *Best Practice Res Clin Gastroenterol* 2005;19:251-261.
- <sup>2</sup> Rosen FS, Pinsky J, Donaldson V, Charache P. Hereditary angioneurotic edema: wo genetic variants. *Science* 1965;148:957-8.
- <sup>3</sup> Kramer J, Rosen FS, Colten HR, Rajczy K, Strunk RC. Transinhibition of C1 inhibitor synthesis in type I hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest* 1993;91:1258-62.
- <sup>4</sup> Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Nov*;56(2):131-90.
- <sup>5</sup> Bowen B, Hawk JJ, Sibunka S, Hovick S, Weiler JM5. *Clin Immunol* 2001;98:157-63.
- <sup>6</sup> Kalmar L, Hegedus T, Farkas H, Nagy M, Tordai A. *Hum Mutat* 2005;25:1-5.
- <sup>7</sup> Agostoni A, Cicardi M235 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992;71:206-15.
- <sup>8</sup> Cicardi M, Bergamaschini L, Cugno M et al. Pathogenetic and clinical aspects of C1 inhibitor deficiency. *Immunobiology* 1998;199:366-76.
- <sup>9</sup> Winnewisser J, Rossi M, Spath P, Burgi H. Type I hereditary angio-oedema. Variability of clinical presentation and course within two large kindreds. *J Intern Med* 1997;241:39-46.
- <sup>10</sup> Bors A, Csuka D, Varga L, Farkas H, Tordai A, Füst G, Szilagy A. Less severe clinical manifestations in patients with hereditary angioedema with missense C1INH gene mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Jun;131(6):1708-1711.
- <sup>11</sup> Axelrod, S; Davis-Lorton, M . "Urticaria and angioedema". *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 2011 78 (5): 784-802.
- <sup>12</sup> Bork K. Diagnosis and treatment of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2010 28;6(1):15. doi: 10.1186/1710-1492-6-15.
- <sup>13</sup> Konrad Bork, Rouven Kleist, Jochen Hardt and Gunther Witzke Kallikrein-kinin system and fibrinolysis in hereditary angioedema due to factor XII gene mutation Thr309Lys *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2009, 20:325-332.
- <sup>14</sup> Bruce L. Zuraw, *Hereditary Angioedema N Engl J Med* 2008;359:1027-36.
- <sup>15</sup> Weis M: Clinical review of hereditary angioedema: diagnosis and management. *Postgrad Med* 2009; 121: 113-120.
- <sup>16</sup> Prada AE, Zahedi K, Davis AE 3rd. Regulation of C1 inhibitor synthesis. *Immuno biology* 1998;199:377-88.
- <sup>17</sup> Marco Cicardi . Lorenza Zingale . Andrea Zanichelli . Emanuela Pappalardo . Benedetta Cicardi C1 inhibitor: molecular and clinical aspects *Springer Semin Immun* 2005 27:286-298
- <sup>18</sup> Kaplan AP. Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: The role of C1 inhibitor therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Nov;126(5):918-25.
- <sup>19</sup> Kaplan AP, Ghebrehiwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol.* 2010 Aug;47(13):2161-9.
- <sup>20</sup> Zuraw BL: Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, IV: short- and long-term treatment of hereditary angioedema: out with the old and in with the new? *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008, 100(Suppl 2): S13-S18.
- <sup>21</sup> Quastel, M., Harrison, R., Cicardi, M., et al., 1983. Behavior in vivo of normal and dysfunctional C1 inhibitor in normal subjects and patients with hereditary angioneurotic edema. *J. Clin. Invest.* 71, 1041-1046.
- <sup>22</sup> Kramer, J., Katz, Y., Rosen, F., et al., 1991. Synthesis of C1 inhibitor in fibroblasts from patients with type I and type II hereditary angioneurotic edema. *J. Clin. Invest.* 87, 1614-1620.
- <sup>23</sup> 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.
- <sup>24</sup> Davis AE III: The pathophysiology of hereditary angioedema. *Clin Immunol* 2005, 114:3-9.

- 
- <sup>25</sup> Binkley KE. Factor XII mutations, estrogen-dependent inherited angioedema, and related conditions. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010;6:16.
- <sup>26</sup> Γερμενής Α. Το Σύστημα του Συμπληρώματος Κλινική Προσέγγιση ιατρικές εκδόσεις Βήτα Αθήνα copyright 1993 ISBN: 960- 7308- 27-1.
- <sup>27</sup> Fred S. Rosen Alvin E. Davis Deficiencies of C1 inhibitor Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Vol. 19, No. 2, pp. 251–261, 2005.
- <sup>28</sup> Caldwell JR, Ruddy S, Schur PH, Austen KF. Acquired C1 inhibitor deficiency in lymphosarcoma. *Clin Immunol Immunopathol* 1972;1:39-52.
- <sup>29</sup> Melamed J, Alper CA, Cicardi M, Rosen FS. The metabolism of C1 inhibitor and C1q in patients with acquired C1-inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 1986;77:322-6.
- <sup>30</sup> Geha R, Quinti I, Austen K, Cicardi M, Sheffer A, Rosen FS. Acquired C1- inhibitor deficiency associated with antiidiotypic antibody to monoclonal immunoglobulins. *N Engl J Med* 1985;312:534-40.
- <sup>31</sup> Agostoni A, Cicardi M. Drug-induced angioedema without urticaria. *Drug Saf* 2001;24:599-606.
- <sup>32</sup> Irons BK, Kumar A. Valsartan-induced angioedema. *Ann Pharmacother* 2003;37:1024-7.
- <sup>33</sup> Cicardi M, Bergamaschini L, Zingale LC, Gioffre D, Agostoni A. Idiopathic nonhistaminergic angioedema. *Am J Med* 1999;106:650-4.
- <sup>34</sup> Kalmar L, Bors A, Farkas H, Vas S, Fandl B, Varga L et al. Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema. *Hum Mutat* 2003; 22(6):498.
- <sup>35</sup> Longhurst H., Cicardi M. Hereditary angio-oedema *Lancet* 2012; 379: 474–81.
- <sup>36</sup> Agostoni A, Cicardi M. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992; 71: 206–15.
- <sup>37</sup> Bork K, Hardt J, Schicketanz KH, Ressel N. Clinical studies of sudden upper airway obstruction in patients with hereditary angio-oedema due to C1 esterase inhibitor deficiency. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1229–35.
- <sup>38</sup> Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L et al. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:S51-131.
- <sup>39</sup> Bork K, Siedlecki K, Bosch S, Schopf RE, Kreuz W. Asphyxiation by laryngeal edema in patients with hereditary angio-oedema. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 349–54.
- <sup>40</sup> Frank MM, Gelfand JA, Atkinson JP. Hereditary angioedema: the clinical syndrome and its management. *Ann Intern Med* 1976; 84(5):580-93.
- <sup>41</sup> Bygum A. Hereditary angio-oedema in Denmark: a nationwide survey. *Br J Dermatol* 2009; 161: 1153–58.
- <sup>42</sup> Farkas H, Varga L, Szeplaki G, Visy B, Harmat G, Bowen T. Management of hereditary angio-oedema in pediatric patients. *Pediatrics* 2007; 120: e713–22.
- <sup>43</sup> Dagen C, Craig TJ. Treatment of hereditary angioedema: items that need to be addressed in practice parameter. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010;6:11.
- <sup>44</sup> Farkas H: Pediatric hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010, 6:18.
- <sup>45</sup> Bork K, Meng G, Staubach P, Hardt J: Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *Am J Med* 2006, 119:267-74.
- <sup>46</sup> Zingale LC, Beltrami L, Zanichellia A, Maggioni L, Pappalardo E, Cicardi B, Cicardi M: Angioedema without urticaria: a large clinical survey. *CMAJ* 2006, 175:1065-70.
- <sup>47</sup> Bowen T, Cicardi M, Bork K, Zuraw B, Frank M, Ritchie B, et al. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, VII: Canadian Hungarian
- <sup>48</sup> Farkas H, Varga L, Szeplaki G, Visy B, Harmat G, Bowen T: Management of hereditary angioedema in pediatric patients. *Pediatrics* 2007, 120: e713-e722.

- 
- <sup>49</sup> Cicardi M, Zanichelli A: Acquired angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010, 6:14.
- <sup>50</sup> Bowen et al. International consensus algorithm for the diagnosis, therapy and management of hereditary angioedema. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2010;6:24.
- <sup>51</sup> Gompels MM, Lock RJ, Abinun M, Bethune CA, Davies G, Grattan C, Fay AC, Longhurst HJ, Morrison L, Price A, Price M, Watters D: C1 inhibitor deficiency: consensus document. *Clin Exp Immunol* 2005, 139:379-94.
- <sup>52</sup> Zuraw BL. Clinical practice. Hereditary angioedema. *N Engl J Med* 2008;359:1027–36.
- <sup>53</sup> Bock PE, Srinivasan KR, Shore JD. Activation of intrinsic blood coagulation by ellagic acid: insoluble ellagic acid-metal ion complexes are the activating species. *Biochemistry* 1981;20(25):7258-66.
- <sup>54</sup> Schmaier AH, McCrae KR. The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. *J Thromb Haemost* 2007;5:2323–2329.
- <sup>55</sup> Renné T, Pozgajová M, Grüner S, Schuh K, Pauer H-U, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B. The *Journal of Experimental Medicine* 2005;202(2):271-81.
- <sup>56</sup> Donaldson VH, Ratnoff OD, Silva WDD, Rosen FS: Permeability-increasing activity in hereditary angioneurotic edema plasma. *J Clin Invest* 1969, 48:642-653.
- <sup>57</sup> Fields T, Ghebrewhet B, Kaplan A: Kinin formation in hereditary angioedema plasma: evidence against kinin derivation from C2 and in support of spontaneous formation of bradykinin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1983, 72(1):54-60.
- <sup>58</sup> Shoemaker LR, Schurman SJ, Donaldson VH, Davis AE III: Hereditary angioneurotic edema: Characterization of plasma kinin and vascular permeability-enhancing activities. *Clin Exp Immunol* 1994, 95:22-28.
- <sup>59</sup> Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A: Plasma bradykinin in angioedema. *Lancet* 1998, 351:1693-1697.
- <sup>60</sup> Nussberger J, Cugno M, Cicardi M, Agostoni A: Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 1999, 104:1321-1322.
- <sup>61</sup> Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, Agostoni A: Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood* 1997, 89:3213-3218.
- <sup>62</sup> Cugno M, Hack CE, Boer JPD, Eerenberg AJ, Agostoni A, Cicardi M: Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema. *J Lab Clin Med* 1993, 121:38-43.
- <sup>63</sup> Davis AE III: Mechanism of angioedema in first complement component inhibitor deficiency. *Immunol Allergy Clin North America* 2006, 26:633-651.
- <sup>64</sup> Fay A, Abinun M: Current management of hereditary angioedema (C1 esterase inhibitor deficiency). *J Clin Pathol* 2002, 55:266-270.
- <sup>65</sup> Bos IGA, Hack CE, Abrahams JP: Structural and functional aspects of C1-inhibitor. *Immunobiol* 2002, 205:518-533.
- <sup>66</sup> Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, Agostoni A: Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood* 1997, 89:3213-3218.
- <sup>67</sup> Pixley RA, Schapira M, Colman RW: The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 1985, 260:1723-1729.
- <sup>68</sup> Booth NA, Walker E, Maughan R, Bennett B: Plasminogen activator in normal subjects after exercise and venous occlusion: tPA circulates as complexes with C1-inhibitor and PAI-1. *Blood* 1987, 69:1600-1604.
- <sup>69</sup> de Agostini A, Lijnen HR, Pixley RA, Colman RW, Schapira M: Inactivation of factor-XII active fragment in normal plasma: predominant role of C1-inhibitor. *J Clin Invest* 1984, 93:1542-1549
- <sup>70</sup> Schapira M, Scott CF, Colman RW: Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallikrein in plasma. *J Clin Invest* 1982, 69:462-468.
- <sup>71</sup> van der Graaf F, Koedam JA, Bouma BN: Inactivation of kallikrein in human plasma. *J Clin Invest* 1983, 71:149-158.

- 
- <sup>72</sup> Ratnoff OD, Busse RJ, Sheon RP. The demise of John Hageman. *N Engl J Med* 1968;279:760–761
- <sup>73</sup> Ratnoff OD, Colopy JE. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin. Invest.* 1955;34:602–613.
- <sup>74</sup> Ratnoff OD, Davie EW, Mallett DL. Studies on the action of Hageman factor: evidence that activated Hageman factor in turn activates plasma thromboplastin antecedent. *J Clin Invest* 1961;40:803–819.
- <sup>75</sup> Riddell, D. C., Wang, H., Royle, N. J., Nigli, M., Guinto, E., Kochinsky, M. L., Irwin, D. M., Cool, D., MacGillivray, R. T. A., Hamerton, J. L. Regional assignment for the human genes encoding FII, FV, FXII, ceruloplasmin and pseudoceruloplasmin. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 1987;46:682.
- <sup>76</sup> Royle, N. J., Nigli, M., Cool, D., MacGillivray, R. T., Hamerton, J. L. Structural gene encoding human factor XII is located at 5q33-qter. *Somat. Cell Molec. Genet.* 1988;14: 217–221.
- <sup>77</sup> [http://en.wikipedia.org/wiki/Kringle\\_domain](http://en.wikipedia.org/wiki/Kringle_domain)
- <sup>78</sup> Evi Stavrou and Alvin H. Schmaier. Factor XII: What Does It Contribute To Our Understanding Of The Physiology and Pathophysiology of Hemostasis & Thrombosis *Thromb Res.* 2010 March;125(3):210–215.
- <sup>79</sup> Petersen TE, Thogersen HC, Skorstengaard K, Vibe-Pedersen K, Sahl P, Sottrup-Jensen L, et al. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 Jan;80(1):137–141.
- <sup>80</sup> Yamada KM. Cell surface interactions with extracellular materials. *Annu Rev Biochem* 1983;52:761–799.
- <sup>81</sup> Clarke BJ, Cote HC, Cool DE, Clark-Lewis I, Saito H, Pixley RA, et al. Mapping of a putative surface binding site of human coagulation factor XII. *J Biol Chem* 1989 Jul 5;264(19):11497–11502.
- <sup>82</sup> Samuel M, Samuel E, Villanueva GB. Histidine residues are essential for the surface binding and autoactivation of human coagulation factor XII. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 Feb 26;191(1):110–117.
- <sup>83</sup> Pixley RA, Stumpo LG, Birkmeyer K, Silver L, Colman RW. A monoclonal antibody recognizing an icosapeptide sequence in the heavy chain of human factor XII inhibits surface-catalyzed activation. *J Biol Chem* 1987 Jul 25;262(21):10140–10145.
- <sup>84</sup> Citarella F, Ravon DM, Pascucci B, Felici A, Fantoni A, Hack CE. Structure/function analysis of human factor XII using recombinant deletion mutants. Evidence for an additional region involved in the binding to negatively charged surfaces. *Eur J Biochem* 1996 May 15;238(1):240–249.
- <sup>85</sup> Citarella F, Fedele G, Roem D, Fantoni A, Hack CE. The second exon-encoded factor XII region is involved in the interaction of factor XII with factor XI and does not contribute to the binding site for negatively charged surfaces. *Blood* 1998 Dec 1;92(11):4198–4206.
- <sup>86</sup> Henderson LM, Figueroa CD, Muller-Esterl W, Bhoola KD. Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. *Blood* 1994 Jul 15;84(2):474–482.
- <sup>87</sup> Bradford HN, Pixley RA, Colman RW. Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 2000 Jul 28;275(30):22756–22763.
- <sup>88</sup> Mahdi F, Madar ZS, Figueroa CD, Schmaier AH. Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Blood* 2002 May 15;99(10):3585–3596.
- <sup>89</sup> Cool DE, Edgell CJ, Louie GV, Zoller MJ, Brayer GD, MacGillivray RT. Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. Prediction of the primary structure of factor XII and the tertiary structure of beta-factor XIIa. *J Biol Chem* 1985 Nov 5;260(25):13666–13676.
- <sup>90</sup> Citarella F, te Velthuis H, Helmer-Citterich M, Hack CE. Identification of a putative binding site for negatively charged surfaces in the fibronectin type II domain of human factor XII — an immunochemical and homology modeling approach. *Thromb Haemost* 2000 Dec;84(6):1057–1065.

- 
- <sup>91</sup> Revak SD, Cochrane CG, Griffin JH. The binding and cleavage characteristics of human Hageman factor during contact activation. A comparison of normal plasma with plasmas deficient in factor XI, prekallikrein, or high molecular weight kininogen. *J Clin Invest* 1977 Jun;59(6):1167–1175.
- <sup>92</sup> Fujikawa K, McMullen BA. Amino acid sequence of human beta-factor XIIIa. *J Biol Chem* 1983 Sep 25;258(18):10924–10933.
- <sup>93</sup> Dunn JT, Silverberg M, Kaplan AP. The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kallikrein. *J Biol Chem* 1982 Feb 25;257(4):1779–1784.
- <sup>94</sup> Farsetti A, Misiti S, Citarella F, Felici A, Andreoli M, Fantoni A, et al. Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression. *Endocrinology* 1995 Nov;136(11):5076–5083.
- <sup>95</sup> Spronk H, Heemskerk JW, Ten Cate H, Knecht ML, Gailani D, Pawlinski R, et al. Feedback activation of factor XI by thrombin is essential for haemostasis in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009;7(s2):1–316.
- <sup>96</sup> Proctor RR, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 1961 Sep;36:212–219.
- <sup>97</sup> Renne T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, et al. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 2005 Jul 18;202(2):271–281.
- <sup>98</sup> Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, et al. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 2006 Mar 20;203(3):513–518.
- <sup>99</sup> Jacques Caen and Qingyu Wu. Hageman Factor, Platelets and Polyphosphates: Early History and Recent Connection. *J Thromb Haemost*. 2010 August;8(8):1670–1674.
- <sup>100</sup> Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Apr 10;104(15):6388–6393.
- <sup>101</sup> van der Meijden PE, Munnix IC, Auger JM, Govers-Riemslog JW, Cosemans JM, Kuijpers MJ, et al. Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus formation. *Blood* 2009 Jul 23;114(4):881–890.
- <sup>102</sup> Santamaria A, Mateo J, Tirado I, Oliver A, Belvis R, Marti-Fabregas J, et al. Homozygosity of the T allele of the 46 C>T polymorphism in the F12 gene is a risk factor for ischemic stroke in the Spanish population. *Stroke* 2004 Aug;35(8):1795–1799.
- <sup>103</sup> Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, et al. A quantitative-trait locus in the human factor XII gene influences both plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am J Hum Genet* 2002 Mar;70(3):567–574.
- <sup>104</sup> Calafell F, Almasy L, Sabater-Lleal M, Buil A, Mordillo C, Ramirez-Soriano A, et al. Sequence variation and genetic evolution at the human F12 locus: Mapping quantitative trait nucleotides that influence FXII plasma levels. *Hum Mol Genet* 2010;19:517–525.
- <sup>105</sup> Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, Niho Y. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood*. 1998 Mar 15;91(6):2010-4.
- <sup>106</sup> Zito F, Lowe GD, Rumley A, McMahan AD, Humphries SE. Association of the factor XII 46C>T polymorphism with risk of coronary heart disease (CHD) in the WOSCOPS study. *Atherosclerosis* 2002 Nov;165(1):153–158.
- <sup>107</sup> Endler G, Mannhalter C, Sunder-Plassmann H, Lalouschek W, Kapiotis S, Exner M, et al. Homozygosity for the C->T polymorphism at nucleotide 46 in the 5' untranslated region of the factor XII gene protects from development of acute coronary syndrome. *Br J Haematol* 2001 Dec;115(4):1007–1009.
- <sup>108</sup> Colhoun HM, Zito F, Norman Chan N, Rubens MB, Fuller JH, Humphries SE. Activated factor XII levels and factor XII 46C>T genotype in relation to coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes and healthy subjects. *Atherosclerosis* 2002 Aug;163(2):363–369.

- 
- <sup>109</sup>Doggen CJ, Rosendaal FR, Meijers JC. Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: Opposite and synergistic effects of factors XI and XII. *Blood* 2006 Dec 15;108(13):4045–4051.
- <sup>110</sup>Gailani D, Renne T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost* 2007 Jun;5(6):1106–1112.
- <sup>111</sup>Bach J, Endler G, Winkelmann BR, Boehm BO, Maerz W, Mannhalter C, Hellstern P. Coagulation factor XII (FXII) activity, activated FXII, distribution of FXII C46T gene polymorphism and coronary risk. *J Thromb Haemost* 2008;6:291-296.
- <sup>112</sup>Qi L, Li JM, Sun H, Huang XQ, Lin KQ, Chu JY, Yang ZQ. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. Association between gene polymorphisms and myocardial infarction in Han Chinese of Yunnan province. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2012 Aug;29(4):413-9.
- <sup>113</sup>Walch K, Riener EK, Tempfer CB, Endler G, Huber JC, Unfried G. The C46T polymorphism of the coagulation factor XII gene and idiopathic recurrent miscarriage. *BJOG*. 2005 Oct;112(10):1434-6
- <sup>114</sup>Weger M, Renner W, Steinbrugger I, Cichocki L, Temmel W, Stanger O, El-Shabrawi Y, Lechner H, Schmut O, Haas A. Role of thrombophilic gene polymorphisms in branch retinal vein occlusion. *Ophthalmology*. 2005 Nov;112(11):1910-5.
- <sup>115</sup>Barabe J., Drouin J.-N., Regoli D., and Park W. K. Receptors for bradykinin in intestinal and uterine smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1977;55: 1270-1285.
- <sup>116</sup>Regoli D., Barabe J. and Park W. K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1977;55: 855-867.
- <sup>117</sup>Regoli D. and Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmac. Rev.* 1980;32:1-46.
- <sup>118</sup>Flavahan NA, Vanhoutte PM. G-proteins and endothelial responses. *Blood Vessels* 1990;27:218-229.
- <sup>119</sup>Menke, J. G., Borkowski, J. A., Bierilo, K. K., MacNeil, T., Derrick, A. W., Schneck, K. A., Ransom, R. W., Strader, C. D., Linemeyer, D. L., Hess, J. F. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* 1994;269:21583-21586.
- <sup>120</sup>Chai, K. X., Ni, A., Wang, D., Ward, D. C., Chao, J., Chao, L. Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics* 1996;31:51-57.
- <sup>121</sup>Bachvarov, D. R., Hess, J. F., Menke, J. G., Larrivee, J.-F., Marceau, F. Structure and genomic organization of the human B(1) receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics* 1996;33:374-381.
- <sup>122</sup>Ross D and Joyner WL. Resting distribution and stimulated translocation of protein kinase C isoforms alpha, epsilon and zeta in response to bradykinin and TNF in human endothelial cells. *Endothelium* 1997;5:321–332.
- <sup>123</sup>Marceau F: Kinin receptors: A review. *Immunopharmacology* 1995;30:1-26.
- <sup>124</sup>Menke JO, Borkowski IA, Bieribo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess FJ: Expression cloning of a human bradykinin receptor. *J Biol Chem* 1994;269:21583-21586.
- <sup>125</sup>Wang DZ, Chao L, Chao J: Cellular localization of bradykinin B I receptor mRNA in the human kidney. *Immunopharmacology* 1996;33:151-156.
- <sup>126</sup>Braun A, Kammerer S, Bohme E, Muller B, Roscher AA. Identification of polymorphic sites of the human bradykinin B2 receptor site. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;211:234–240.
- <sup>127</sup>Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.* 2005 Mar;57(1):27-77.
- <sup>128</sup>Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Nov*;56(2):131-90.
- <sup>129</sup>Zeitelin I. J. and Smith A. N. Mobilization of tissue kallikrein in inflammatory disease of the colon. *Gut* 1973;14:133-138.
- <sup>130</sup>Smith K. A. T-cell growth factor. *Immun. Rev.* 1980;51:337-357.



- 
- <sup>131</sup>Kaya H, Patton GM, Hong SL. Bradykinin-induced activation of phospholipase A 2 is independent of the activation of polyphosphoinositide-hydrolyzing phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 1989;264:4972-4977.
- <sup>132</sup>Gaginella TS, Kachur JF. Kinins as mediators of intestinal secretion. *Am. J. Physiol.* 1989;256: G1-15
- <sup>133</sup>Marceau F, Barabé J, St-Pierre S, Regoli D. Kinin receptors in experimental inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1980;58:536-542.
- <sup>134</sup>Collier H. O. J. and Shorley P. G. Analgesic antipyretic drugs as antagonists of bradykinin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1960;15:601-610.
- <sup>135</sup>Issandou M. and Darbon J.-M. Des-arg9-bradykinin modulates DNA synthesis, phospholipase C and protein kinase C in cultured mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 1991;266:2103-21043.
- <sup>136</sup>Marceau F, Lussier A, Regoli D, Giroud JP. Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen. Pharmacol.* 1983;14:209-229.
- <sup>137</sup>Ljunggren O, Lerner UH. Evidence for B1 bradykinin-receptor-mediated prostaglandin information in osteoblasts and subsequent enhancement of bone resorption. *Br. J. Pharmacol.* 1990;101:382-386.
- <sup>138</sup>Bachvarov DR, Landry M, Pelletier I, Chevrette M, Betard C, Houde I, et al. Characterization of two polymorphic sites in the human kinin B1 receptor gene: altered frequency of an allele in patients with a history of end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:598-604.
- <sup>139</sup>Knigge H, Bluthner M, Bruntgens A, Sator H, Ritz E. G(-699)/C polymorphism in the bradykinin-1 receptor gene in patients with renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:586-588.
- <sup>140</sup>Zychma MJ, Gumprecht J, Trautsolt W, Szydłowska I, Grzeszczak W. Polymorphic genes for kinin receptors, nephropathy and blood pressure in type 2 diabetic patients. *Am J Nephrol* 2003;23:112-116.
- <sup>141</sup>Kusser B, Braun A, Praun M, Illi S, von Mutius E, Roscher AA. Biol Chem. Polymorphisms in the bradykinin B2 receptor gene and childhood asthma. *Biol Chem.* 2001 May;382(5):885-9.
- <sup>142</sup>Ratnoff OD, Davie EW, Mallett DL. Studies on the action of Hageman factor: evidence that activated Hageman factor in turn activates plasma thromboplastin antecedent. *J Clin Invest* 1961;40:803-819.
- <sup>143</sup>Bachvarov DR, Landry M, Houle S, Pare P, Marceau F. Altered frequency of a promoter polymorphic allele of the kinin B1 receptor gene in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115:1045-1048.
- <sup>144</sup>Lung CC, Chan EK, Zuraw BL. Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:134-146.
- <sup>145</sup>Houle S, Landry M, Audet R, Bouthillier J, Bachvarov DR, Marceau F: Effect of allelic polymorphism of the B1 and B2 receptor genes on the contractile responses of the human umbilical vein to kinins. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jul;294(1):45-51.
- <sup>146</sup>Chien-Cheng Lung, Edward K.L. Chan, Bruce L. Zuraw. Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Jan;99(1 Pt 1):134-46.
- <sup>147</sup>Freiberger T, Vyskocilová M, Kolářová L, Kuklínek P, Krystůfková O, Lahodná M, Hanzlíková J, Litzman J. Exon 1 polymorphism of the B2BKR gene does not influence the clinical status of patients with hereditary angioedema. *Hum Immunol.* 2002 Jun;63(6):492-4.
- <sup>148</sup>Freiberger T, Grombířková H, Ravčuková B, Jarkovský J, Kuklínek P, Kryštůfková O, Hanzlíková J, Daňková E, Kopecký O, Zachová R, Lahodná M, Vašáková M, Grodecká L, Litzman J. No evidence for linkage between the hereditary angioedema clinical phenotype and the BDKR1, BDKR2, ACE or MBL2 gene. *Scand J Immunol.* 2011 Jul;74(1):100-6.
- <sup>149</sup>Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997;90:3819-3843.

- 
- <sup>150</sup>Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992;44:1-80.
- <sup>151</sup>Santamaria A, Mateo J, Tirado I, Oliver A, Belvis R, Marti-Faabregas J, et al. Homozygosity of the T allele of the 46 C>T polymorphism in the F12 gene is a risk factor for ischemic stroke in the Spanish population. *Stroke* 2004;35:1795–1799.
- <sup>152</sup>Cumming SA, Halsall DJ, Ewan PW, Lomas DA. The effect of sequence variations within the coding region of the C1 inhibitor gene on disease expression and protein function in families with hereditary angio-oedema. *J Med Genet* 2003;40:e114.
- <sup>153</sup>Zito F, Drummond F, Bujac SR, Esnouf MP, Morrissey JH, Humphries SE, Miller GJ Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinogen concentration, and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 2000;102(17):2058-62.
- <sup>154</sup>Bork K, Hardt J, Schicketanz KH, Ressel. Clinical studies of sudden upper airway obstruction in patients with hereditary angioedema due to C1 esterase inhibitor deficiency. *N Arch Intern Med*. 2003 May 26;163(10):1229-35.
- <sup>155</sup>Bork K, Siedlecki K, Bosch S, Schopf RE, Kreuz W. Asphyxiation by laryngeal edema in patients with hereditary angioedema. *Mayo Clin Proc*. 2000 Apr;75(4):349-54.
- <sup>156</sup>Bowen B, Hawk JJ, 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;98:157-63.
- <sup>157</sup>Kalmar L, Bors A, Farkas H, Vas S, Fandl B, Varga L et al. Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema. *Hum Mutat* 2003;22(6):498.
- <sup>158</sup>Duponchel C, Djenouhat K, Fremeaux-Bacchi V, Monnier N, Drouet C, Tosi M. Functional analysis of splicing mutations and of an exon 2 polymorphic variant of SERPING1 / C1NH. *Hum Mutat* 2006;27:295–6.
- <sup>159</sup>Freiberger T, Kolarova L, Mejstrik P, Vyskocilova M, Kuklinek P, Litzman J. Five novel mutations in the C1 inhibitor gene (C1NH) leading to a premature stop codon in patients with type I hereditary angioedema. *Hum Mutat* 2002;19:461.
- <sup>160</sup>Muller F, Renne T. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. *Curr Opin Hematol* 2008;15:516-521.
- <sup>161</sup>Bachvarov DR, Landry M, Pelletier I et al. Characterization of two polymorphic sites in the human kinin B1 receptor gene: altered frequency of an allele in patients with a history of end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:598–604.
- <sup>162</sup>Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, et al. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 59-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood* 1998;91:2010-4.
- <sup>163</sup>Bork K, Meng G, Staubach P, Hardt Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course *J Am J Med*. 2006 Mar;119(3):267-74.