



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ

Διευθύντρια: Καθηγήτρια Δέσποινα Κυριάκου

---

*Διδακτορική Διατριβή*

*" ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ Activin-like Kinase 1*

*ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΙΣ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΜΕ*

*ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΗ ΤΗΛΑΓΓΕΙΕΚΤΑΣΙΑ"*

υπό

**ΧΡΗΣΤΟΥ Κ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ**

Βιοχημικού - Βιοτεχνολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2015

© 2009 Χρήστος Παπανικολάου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (5<sup>η</sup>/17-12-2014 ΓΣΕΣ):**

- 1<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Δέσποινα **Κυριάκου**  
**(Επιβλέπουσα)** Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγίσεων, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Νικόλαος **Σταθάκης**  
Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Χρήστος **Παπανδρέου**  
Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 4<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Λάζαρος **Σακκάς**  
Καθηγητής Ρευματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 5<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Μιχαήλ **Αλεξανδράκης**  
Καθηγητής Αιματολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 6<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Ιωάννης **Στεφανίδης**  
Καθηγητής Νεφρολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7<sup>ος</sup> Εξεταστής** Δρ. Ασπασία **Τσέζου**  
Καθηγήτρια Γενετικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Οφείλω, πρωτίστως, θερμά να ευχαριστήσω την κα Κυριάκου Δέσποινα, Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία μου έδωσε τη δυνατότητα και μου εμπιστεύτηκε την εκπόνηση της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ ολόψυχα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Σταθάκη Νικόλαο, Ομότιμο Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής και κ. Παπανδρέου Χρήστο, Καθηγητή Ογκολογίας, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη συμβολή τους στην εκπόνηση της παρούσης διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους του Εργαστηρίου Αιματολογίας και Αιμοδοσίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ιδιαίτερος οφείλω να ευχαριστήσω την κα. Θεοδοσίου Βασιλική, συνάδελφο βιοχημικό και διδάκτορα του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με την οποία εκπονήσαμε παράλληλα τις διδακτορικές μας διατριβές και η οποία στάθηκε πολύτιμη σύμβουλος και βοηθός σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Εκ βάθους καρδιάς οφείλω να ευχαριστήσω την δις Γκούγκουρα Σοφία, συνάδελφο και φίλη, Βιοχημικό-Βιοτεχνολόγο, διδάκτορα του Τμήματος Ιατρικής, του Τμήματος Θεσσαλίας, για την αμέριστη και ανιδιοτελή συμπαράσταση και στήριξη προς το πρόσωπο μου όλα αυτά τα χρόνια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Επιπλέον οφείλω να ευχαριστήσω θερμά την κα Παπαϊωάννου Μυρτώ, επιστημονική συνεργάτιδα του ερευνητικού μας έργου για τις πολύτιμες συμβουλές της και την καθοδήγηση της στο πειραματικό κομμάτι της διατριβής αυτής.

Θερμές ευχαριστίες αποδίδω στην κα Κορώνα Ευαγγελία, Μοριακή Βιολόγο και Γενετίστρια, υποψήφια διδάκτρα του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την δις Σκούρα Σοφία, Βιολόγο, οι οποίες συνέβαλαν στην διεκπαιρέωση ενός τμήματος του πειραματικού μέρους της διατριβής αυτής.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου, τα αδέρφια μου και τη γιαγιά μου για όλη τους την συμπαράσταση σε όλο αυτό το στάδιο της ζωής μου, καθώς ήταν πολύτιμοι αρωγοί ηθικής και ψυχολογικής στήριξης στις όποιες ευκολίες ή δυσκολίες αντιμετώπισα.

Τέλος ευχαριστώ όλους τους φίλους μου, οι οποίοι με τον τρόπο τους μου έδιναν δύναμη και κουράγιο για να ανταπεξέλθω σε αυτό το στάδιο.

*Παπανικολάου Χρήστος*

Το παρόν σύγγραμμα αφιερώνεται εξαιρετικά,

*Στους γονείς μου Κωνσταντίνο και Αναστασία  
για την αμέριστη συμπαράστασή τους,*

*Στη γιαγιά μου Αμαλία*

*Στον αείμνηστο αδερφό μου Σπυρίδωνα*

## **ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ**

**Παπανικολάου Χρήστος**

Λάρισα, 2015

### **I. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

- **ΟΝΟΜΑ:** ΧΡΗΣΤΟΣ
- **ΕΠΩΝΥΜΟ:** ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ
- **ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΕΡΑ:** ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
- **ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ:** ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
- **ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:** ΛΑΡΙΣΑ
- **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ:** 19-04-1982
- **ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:** ΑΓΑΜΟΣ
- **ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ:** ΕΛΛΗΝΙΚΗ
- **ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ:** Λ. ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΥ ΒΕΝΙΖΕΛΟΥ 172  
Τ.Κ 17675 ΚΑΛΛΙΘΕΑ ΑΤΤΙΚΗΣ
- **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:** ΑΓΓΛΙΚΑ
- **ΤΗΛΕΦΩΝΟ:** 215-5056065, 6974029061

### **I. ΤΙΤΛΟΙ ΚΑΙ ΣΠΟΥΔΕΣ**

1. Απολυτήριο Λυκείου (6<sup>ο</sup> Ενιαίο Λύκειο Λάρισας), (Ιούνιος 2000).
2. Πτυχίο Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Σχολής Επιστημών Υγείας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Νοέμβριος 2005).
3. First Certificate in English (University of Michigan), Ιούνιος, 2000.

### **II. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

**7-10 Οκτωβρίου 2004 - 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες, Λάρισα, Ελλάδα.**

**“Μέθοδος προσδιορισμού ισομερών του ρετινοϊκού οξέος και ρετινόλης στον ορό, με HPLC και ηλεκτροχημική ανίχνευση”**

**2-4 Μαΐου 2005 - Nutrition, Oxygen Biology and Medicine, Paris, France**

**“Serum retinal and retinoic acid levels in patients with chronic viral hepatitis”**

**6-8 Δεκεμβρίου 2013 - 64<sup>ο</sup> συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (EEBMB)**

**“Genetic analysis of the ACVRL1 gene in a large Greek family with HHT**

### **III. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ-ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ**

- 24-25 Νοέμβριου 2000: Παρακολούθηση του 52<sup>ου</sup> συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρίας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας (EEBMB).**
- 13-15 Δεκεμβρίου 2001: Παρακολούθηση του 53<sup>ου</sup> συνεδρίου της EEBMB.**
- 25-27 Οκτωβρίου 2002: Παρακολούθηση του 54<sup>ου</sup> συνεδρίου της EEBMB.**
- 13-15 Νοεμβρίου 2003: Παρακολούθηση του 55<sup>ου</sup> συνεδρίου της EEBMB.**
- 18-20 Μαρτίου 2004: Παρακολούθηση του 31<sup>ου</sup> Πανελληνίου συνεδρίου Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού.**
- 7-10 Οκτωβρίου 2004: Συμμετοχή στο 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες.**
- 25-27 Νοεμβρίου 2004: Παρακολούθηση του 56<sup>ου</sup> συνεδρίου της EEMBB.**
- 18-20 Μαΐου 2006: Παρακολούθηση του 28<sup>ου</sup> συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών.**
- 28 Σεπτεμβρίου-1 Οκτωβρίου 2006 Παρακολούθηση του 5<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες.**
- 30 Νοεμβρίου-1 Δεκεμβρίου 2007: Παρακολούθηση του Διεθνούς συμποσίου «Γονιδιωματική & Νανοτεχνολογία στη Βιοιατρική».**
- 7-9 Δεκεμβρίου 2007: Παρακολούθηση του 59<sup>ου</sup> συνεδρίου της EEMBB.**
- 23 Φεβρουαρίου 2008: Παρακολούθηση της ημερίδας «Πρωτοβάθμια Φροντίδα Υγείας από τη Θεωρία στην Πράξη».**
- 28 Ιουνίου-3 Ιουλίου 2008: Παρακολούθηση του 33<sup>ου</sup> συνεδρίου της FEBS & 11<sup>ου</sup> συνεδρίου IUBMB.**
- 26-28 Σεπτεμβρίου 2008: Παρακολούθηση του 3<sup>ου</sup> πανελληνίου συνεδρίου «Περιβάλλον και Υγεία».**
- 26 Σεπτεμβρίου 2008: Παρακολούθηση επιμορφωτικού σεμιναρίου με θέμα «Μελέτη Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων».**
- 20-22 Νοεμβρίου 2009: Παρακολούθηση του 60<sup>ου</sup> συνεδρίου της EEMBB.**
- 11-12 Φεβρουαρίου 2011: Παρακολούθηση διημερίδας με θέμα «Πρόληψη και Θεραπεία Καρδιομεταβολικών Παραγόντων Κινδύνου: Σύγχρονες απόψεις».**
- 25-27 Νοεμβρίου 2010: Παρακολούθηση 5<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Βιοεπιστημών.**

**" ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΟΥ *Activim-like Kinase 1***

**ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΣΤΙΣ ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΕΣ ΜΕ**

**ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΗ ΤΗΛΑΓΓΕΙΕΚΤΑΣΙΑ "**

**ΧΡΗΣΤΟΣ ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ**

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2015**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Δρ. Δέσποινα Κυριάκου, Καθηγήτρια Ιατρικής των Μεταγγίσεων, Τμήμα  
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- (Επιβλέπουσα),**
- 2. Δρ. Νικόλαος Σταθάκης, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα  
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**
- 3. Δρ. Χρήστος Παπανδρέου, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Τμήμα  
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**



## Περίληψη

Προσδιορισμένη σχεδόν έναν αιώνα πριν η κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειακτασία (HHT) ή νόσος Rendu –Osler –Weber, θεωρούνταν για πολύ καιρό μία σπάνια περίπτωση, που προκαλεί ελάχιστα δυσάρεστα συμπτώματα στα προσβεβλημένα άτομα. Οι αναγνωρισμένες εκδηλώσεις της κληρονομικής αιμορραγικής τηλαγγειακτασίας οφείλονται όλες σε ανωμαλίες της κατασκευής και της δομής των αγγείων. Οι πάσχοντες παρουσιάζουν μεγάλο εύρος συμπτωμάτων, ενώ οι κλινικές εκδηλώσεις συχνά διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των οικογενειών, αλλά και μεταξύ των μελών της ίδιας οικογένειας. Οι ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις της κληρονομικής αιμορραγικής τηλαγγειακτασίας περιλαμβάνουν αγγειακές διαταραχές (AVMs) στο ρινικό και στοματικό βλεννογόνο, στο δέρμα, στον εγκέφαλο, στον γαστρεντερικό βλεννογόνο, στο ήπαρ και στους πνεύμονες (PAVMs).

Η HHT είναι γενετικά ετερογενής και διακρίνεται σε HHT-1 και HHT-2 και HHT-3, σύμφωνα με μεταλλάξεις στο γονίδιο της ενδογλίνης (*ENG*), στο γονίδιο ακτιβίνης A υποδοχέα τύπου II (*ACVRL1*) στο γονίδιο *SMAD4*, αντίστοιχα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αναζήτηση παρόμοιων μεταλλάξεων ή και νέων, να ερευνηθεί αν οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ACVRL1* που έχουν ήδη ταυτοποιηθεί είναι υπεύθυνες για την Κληρονομική Αιμορραγική Τηλαγγειακτασία Τύπου 2, που παρουσιάζουν οι ασθενείς στην Ελλάδα.

Χρησιμοποιήθηκαν ασθενείς που προσήλθαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας το χρονικό διάστημα 2007-2011. Οι 14 ασθενείς κατάγονται από τη Θεσσαλία. (διάμεση ηλικία  $\pm 65$  έτη). Όλοι οι ασθενείς έδωσαν την συγκατάθεση συμμετοχής στην μελέτη.

Συλλέχθηκε ολικό αίμα και ακολούθησε απομόνωση του DNA με τη μέθοδος της φαινόλης-χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης. Ακολούθησε πολλαπλασιασμός των εξονίων των υπεύθυνων γονιδίων με την μέθοδο της PCR. Το γονίδιο *ACVRL1* αποτελείται από 9 εξόνια, όπου σε όλα έχουν εντοπιστεί οι έως τώρα γνωστές μεταλλάξεις. Για την διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκαν περιβάλλοντες εκκινητές (flanking primers) για το κάθε εξόνιο, που έχει σχεδιαστεί στο εργαστήριό μας με βάση τις αλληλουχίες των γονιδίων *ACVRL1* που έχουν καταχωρηθεί στην GenBank (*ACVRL1* – OMIM: 601284; 600376; GenBank: NG\_009549.1, NM\_000020.2). Σε μερικά από τα εξόνια χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της nested PCR, για περαιτέρω ενίσχυση του προϊόντος. Για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA εφαρμόστηκε η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger.

Διαπιστώθηκε μια αντικατάσταση βάσης T από C, στη θέση 11 του ιντρόνιου 3, στην οικογένεια 8. Αυτή η αλλαγή χρήζει μελέτης καθώς δεν αναφέρεται ως παθογόνος ή μη.

Διαπιστώθηκε μια αντικατάσταση βάσης T από C, στη θέση 237 του εξονίου 7 στις οικογένειες 2, 3, 4, 5 και 6. Αυτή η μετάλλαξη χρήζει βαθύτερης μελέτης σε μοριακό επίπεδο προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι παθογόνος μετάλλαξη ή όχι.

Identified almost a century ago, hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), or Osler -Rendu-Weber syndrome, was considered for a long period of time a rare disease that causes only a few unpleasant symptoms, to the infected people. The recognized manifestations of HHT are all due to abnormalities of the vascular structure and vessel construction. Patients present a wide range of clinical symptoms, whereas clinical manifestations highly vary between families and between members of a family as well. The variety of clinical symptoms of hereditary hemorrhagic telangiectasia includes vascular malformations (AVMs) at the nasal and oral mucosa, skin, brain, gastrointestinal tract, liver and lungs. HHT is genetically heterogeneous and discriminates in HHT-1, HHT-2 and HHT-3, according to mutations in the endoglin (*ENG*), activin A type II receptor (*ACVRL1*) and *SMAD4* genes, respectively.

Aim of the present study is to determine mutations, new or already described, in the *ACVRL1* gene and to investigate the responsibility of the identified mutations for the HHT appearance in Greek patients.

Patients, that came to the University Hospital of Larissa for physical examination, between the years 2007-2011, were participated in this study. All 19 patients are coming from the area of Thessaly (average age  $\pm 65$ ). Informal consent was given from all patients to participate to the study.

Peripheral blood was collected from patients and DNA was isolated using the phenol-chloroform-isoamyle alcohol method. Exons of the responsible genes were amplified using the PCR technique. *ACVRL1* gene consists of 9 exons, in which all known mutations have been found. Flanking primers of every exon was used for the PCR amplification, that were designed in our laboratory, according to the nucleotide sequence, of the *ACVRL1* gene existing to the GenBank (*ACVRL1* – OMIM: 601284; 600376; GenBank: NG\_009549.1, NM\_000020.2). Nested PCR was used occasionally for further amplification on a certain PCR product.

Finally, the Sanger sequencing method was used to identify the DNA primary nucleotide sequence.

A point, T to C, substitution was found in the intronic sequence between exons 3 and 4, 11 bases downstream of the exon 3, in family 8. This change requires deeper investigation as it is not referred neither as a hazardous mutation nor as a benign one.

A point, T to C, substitution was found at the 237 nucleotide position of exon 7 in families 2, 3, 4, 5 and 6. Further investigation of this alteration needs to be done to identify if it is a hazardous mutation or not.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	14
1) Εισαγωγή .....	15
1.1) Αιμορραγική Κληρονομική Τηλαγγειεκτασία .....	15
1.1.1 Επιδημιολογία.....	15
1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά-Ιστολογία .....	16
1.1.3 Διαγνωστικά κριτήρια για την ΗΗΤ .....	29
1.1.4 Αντιμετώπιση της ΗΗΤ.....	31
1.1.5 Παθολογική ανατομία .....	33
1.2) Γενετική και μοριακή βάση της ΗΗΤ.....	39
1.2.1) Υπερικογένεια TGF-β.....	39
1.2.2) Υποδοχείς TGF-β .....	40
1.2.3) Σηματοδότηση TGF-β.....	42
1.2.4) Σηματοδότηση TGF-β και αγγειογένεση .....	45
1.2.5) Γενετική ετερογένεια στην ΗΗΤ .....	47
1.2.6) Η γενετική ετερογένεια σχετίζεται με τον κλινικό φαινότυπο .....	48
1.3) <i>ALK1</i> και ΗΗΤ2 .....	51
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	77
2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	78
2.1) ΥΛΙΚΟ .....	78
2.1.1) Κλινική διάγνωση πασχόντων.....	78
2.1.2) Οικογενειακά ιστορικά και γενεαλογικά δέντρα: .....	79
2.2) ΜΕΘΟΔΟΙ.....	89
2.2.1) Απομόνωση DNA.....	89
2.2.2) Φωτομετρικός προσδιορισμός DNA.....	89
2.2.3) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	90
2.2.4) Ηλεκτροφόρηση: .....	92
2.2.5) Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	93

2.2.6) Αλληλούχιση: .....	94
2.2.7) Πέψεις και ένζυμα περιορισμού .....	94
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	95
3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	96
3.1) Πηκτώματα αγαρόζης 2% των εξονίων 2-10.....	96
3.2) Ανάλυση των αλληλουχιών των PCR προϊόντων .....	101
3.2.1) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 2 σε ασθενείς με ΗΗΤ.....	101
3.2.2) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 3 σε ασθενείς με ΗΗΤ.....	101
3.2.3) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 4 σε ασθενείς με ΗΗΤ.....	103
3.2.4) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 5 σε ασθενείς με ΗΗΤ.....	103
3.2.5) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 6 σε ασθενείς με ΗΗΤ.....	103
3.2.6) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 7 σε ασθενείς με ΗΗΤ.....	103
3.2.7) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 8 σε ασθενείς με ΗΗΤ.....	108
3.2.8) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 9 σε ασθενείς με ΗΗΤ.....	108
3.2.9) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 σε ασθενείς με ΗΗΤ.....	108
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	113

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **1) Εισαγωγή**

### **1.1) Αιμορραγική Κληρονομική Τηλαγγειεκτασία**

Το 1896 ο Henri Rendu, με τις παρατηρήσεις του, περιέγραψε την περίπτωση ενός άνδρα 52 ετών, με συχνές ρινορραγίες, καθώς και ένα παρόμοιο ιστορικό του αδερφού του και της μητέρας του[1]. Επιπλέον αναγνώρισε ωχρά αγγειώματα στη μύτη, τα μάγουλα και τα χείλη του ασθενούς του. Έτσι, περιέγραψε για πρώτη φορά την κλασική κλινική εικόνα της κληρονομικής αιμορραγικής τηλαγγειεκτασίας (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia, HHT), ως μια ασθένεια βλεννογονικών και δερματικών τηλαγγειεκτασιών, ρινορραγιών και οικογενειακής φύσεως διασαφηνίζοντας έτσι τη διαφορά από την ασθένεια της αιμοφιλίας. Η επόμενη δεκαετία έφερε σαφείς περιγραφές περιστατικών της ασθένειας από τους William Osler το 1901 και Frederick Parks Weber το 1907. Ο Osler παρατήρησε πως συχνές και δριμείς ρινικές αιμορραγίες σε αυτούς τους ασθενείς συνέβαιναν χωρίς παρόμοιες αιμορραγίες από άλλα δευτερεύοντα τραύματα. Ο όρος αιμορραγική κληρονομική τηλαγγειεκτασία επινοήθηκε από έναν παθολόγο, τον Hanes το 1909, και αργότερα ονομάστηκε επίσης ασθένεια Osler- Rendu-Weber (ORW)[2].

#### **1.1.1 Επιδημιολογία**

Η αιμορραγική τηλαγγειεκτασία έχει ευρεία γεωγραφική κατανομή μεταξύ πολλών εθνών και φυλετικών ομάδων[3]. Οι λευκοί προσβάλλονται περισσότερο και κυρίως Αγγλογερμανοί, Λατίνοι, Σκανδιναβοί και Ιουδαίοι ενώ οι μαύροι πιο σπάνια. Άντρες και γυναίκες προσβάλλονται εξίσου[4]. Στις πρώτες μελέτες της ασθένειας τα συμβάντα εκτιμούνταν στα 1-2 ανά 100.000 άτομα. Όμως η διεισδυτικότητα της HHT σήμερα είναι πολύ πιο συχνή με μέσο όρο 1 στα 10.000 άτομα. Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες στην Γαλλία, την Δανία και την Ιαπωνία ανέδειξαν ποσοστά 1 ανά 5000-8000 άτομα[4,5]. Η ασθένεια κληρονομείται κατά αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και τα προσβεβλημένα άτομα βρίσκονται σε ετερόζυγη κατάσταση ενώ οι ομοζυγωτικές καταστάσεις είναι θανατηφόρες[3]. Στους ασθενείς με HHT η διεισδυτικότητα, η οποία εκτιμάται στο 97-100%, είναι εξαρτώμενη από την ηλικία. Αντίθετα με την υψηλή διεισδυτικότητα, ενδείξεις της ασθένειας μπορεί να μην υπάρχουν μέχρι την ηλικία των 30[6]. Ωστόσο, περίπου το 20% των ασθενών μπορεί να έχουν αρνητικό οικογενειακό ιστορικό, υποδεικνύοντας περιστατικά αυθόρμητων μεταλλάξεων, διαφορές σε ατομικές κλινικές εκδηλώσεις ή μια ανολοκλήρωτη και



ανεπαρκή εξέταση ελέγχου όλων των ατόμων σε μια οικογένεια και των συγγενών τους[3].

### 1.1.2 Κλινικά χαρακτηριστικά-Ιστολογία

Οι διαφορετικές εκδηλώσεις της ΗΗΤ εμπλέκουν αγγειακές ανωμαλίες στη μύτη, το δέρμα, που είναι απλές τηλαγγειεκασίες, και επιπλέον τους πνεύμονες, τον εγκέφαλο, το γαστρεντερικό σύστημα και το ήπαρ, που είναι γνωστές ως αρτηριοφλεβικές δυσμορφίες (arteriovenous malformations, AVMs). Ο πίνακας 1 συνοψίζει τα κλινικά χαρακτηριστικά και τις διαγνωστικές μεθόδους[7].

Προσβαλλόμενο όργανο	Συμβάντα	Τύπος βλάβης	Κλινικά συμπτώματα	Μέθοδοι διάγνωσης
Ρινική κοιλότητα	90%	Τηλαγγειεκτασία	Ρινορραγία	Οπτική θεώρηση
Δέρμα	50-80%	Τηλαγγειεκτασία	Αιμορραγία	Οπτική θεώρηση
Πνεύμονες	>20%	Αρτηριοφλεβική δυσμορφία	Κυάνωση, εγκεφαλικό απόστημα, ημικρανία, δύσπνοια, εμβολική προσβολή,	Μέτρηση αερίων αρτηριών, ηχοκαρδιογραφία αντιπαραβολής, υψηλής ανάλυσης ελικοειδής CT, αγγειογραφία
Κεντρικό νευρικό σύστημα	15%	(Αρτήριο-)φλεβική δυσμορφία	Πονοκέφαλος, υπαραχνοειδή αιμορραγία	MRI, MR-αγγειογραφία
Γαστρεντερική περιοχή	11-25%	Τηλαγγειεκτασία, αγγειοδυσπλασία	Αιμορραγία, ασκίτης, υπερδυναμική κυκλοφορία, πυλαιοσυστηματικές διαφυγές	Ενδοσκοπία, αγγειογραφία, CT
Ήπαρ	≥30%	Αρτηριοφλεβική δυσμορφία	Πνευμονική υπέρταση, χολική ισχαιμία, εγκεφαλοπάθεια	Ενδοσκοπία,

Πίνακας 1: Κλινικά χαρακτηριστικά και διαγνωστικοί μέθοδοι στην κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειεκτασία (ΗΗΤ) (από Sadick et al. 2006 και FS Govani & CL Shovlin 2009).

- **Ρινική κοιλότητα**

Η ρινορραγία είναι η πιο συνήθης κλινική εκδήλωση της ΗΗΤ και μπορεί να οφείλεται, είτε σε αυθόρμητες αιμορραγίες των τηλαγγειεκτασιών του ρινικού βλεννογόνου, είτε επάγεται από τους πιο ενοχλητικά μηδαμινούς παράγοντες, όπως η φυσική άσκηση και η έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες[8,9]. Η ρινορραγία στην ΗΗΤ συνήθως εμφανίζεται στην εφηβεία (10-20 χρονών) και χειροτερεύει καθώς ο ασθενής μεγαλώνει, στα 2/3 των περιστατικών[10]. Περιστασιακά, έχει αναφερθεί πως το πρώτο επεισόδιο ρινορραγίας μπορεί να συμβεί μετά τα 60 έτη[9]. Τα επεισόδια μπορεί να είναι τόσο ήπια που σε μερικές περιπτώσεις δεν υπάρχει υποψία για την παρουσία της ΗΗΤ ή από την αντίθετη πλευρά μπορεί να είναι τόσο σοβαρά που προκαλούν χρόνια αναιμία ώστε να απαιτείται συμπλήρωμα σιδήρου και πολλαπλές μεταγγίσεις. Η συχνότητα των επεισοδίων ποικίλει από μια φορά το χρόνο έως και πολλές καθημερινές ρινορραγίες και γενικότερα αυξάνεται με την άνοδο της ηλικίας με το μέσο όρο να κυμαίνεται στα 18 επεισόδια ανά μήνα[7,9].

- **Δέρμα και βλεννογόνοι**

Οι τηλαγγειεκτασίες του δέρματος και των βλεννογόνων συνήθως παρατηρούνται σε ηλικίες μεταξύ 30-50 ετών. Είναι μικρές αυξανόμενες αλλοιώσεις, χρώματος ανοιχτού κόκκινου ή μωβ, διαφορετικές από κερασοειδή αγγειώματα, κιρρωτικούς αραχνοειδείς σπίλους, ακτινικές και σκληροδερμικές τηλαγγειεκτασίες και συνήθως εξαφανίζονται με μια πίεση από το δάχτυλο. Κατά κανόνα εντοπίζονται στα χείλη, τη γλώσσα, τον ουρανίσκο, τα δάχτυλα, το πρόσωπο, τον επιπεφυκότα, τον κορμό, τα χέρια και τα νύχια (Εικόνα 1). Οι οφθαλμικοί επιπεφυκότες είναι οι λιγότερο προσβεβλημένοι αλλά όταν προσβάλλονται επιδεικνύουν μια υψηλή συγκέντρωση αγγειακών αλλοιώσεων. Οι διαστάσεις και το μέγεθος ποικίλλουν ανάλογα με το χρόνο εξέλιξης της ασθένειας. Από τις τηλαγγειεκτασίες αυτές μπορεί να υπάρξει αιμορραγία, αλλά σπάνια είναι κλινικά σημαντική[9].



Εικόνα 1: Τηλαγγειεκτασίες δέρματος σε ασθενείς με σύνδρομο ΗΗΤ. Α) Τηλαγγειεκτασίες στόματος και χειλιών. Β) Τηλαγγειεκτασίες δακτύλων του χεριού. Γ) Τηλαγγειεκτασίες της υπερώας. Δ) Τηλαγγειεκτασίες προσώπου στα ζυγωματικά και τη μύτη. (Από <http://www.ghorayeb.com/oslerweber.html>, <http://www.aocd.org/?page=HereditaryHemorrhag>, <http://www.head-face-med.com/content/6/1/7/figure/F8?highres=y>)

- **Πνεύμονες**

Το 80-90% περίπου των περιστατικών με πνευμονικά AVMs (pulmonary AVMs, PAVMs) σχετίζονται με την ΗΗΤ[11]. Τα περιστατικά σποραδικών PAVMs έχουν υπερεκτιμηθεί εξαιτίας της υποδιάγνωσης της ΗΗΤ[12]. Αντιστρόφως, περίπου το 15-35% των ασθενών με ΗΗΤ έχουν PAVMs. Τα συμβάντα των PAVMs στην ΗΗΤ ποικίλουν ανάλογα με την γενετική μετάλλαξη που υπάρχει[10,13]. Τα PAVMs σπάνια εκδηλώνονται κλινικά ως την ενηλικίωση του ασθενούς, αλλά ύστερα τα αγγεία υποκύπτουν στην πίεση κάποιων δεκαετιών. Κλινικές παρουσιάσεις στα παιδιά είναι πολύ σπάνιες, αλλά αναγνωρίζονται πιο συχνά στα κέντρα τα οποία προσφέρουν έλεγχο σε οικογένειες με ΗΗΤ για PAVMs και εγκεφαλικά AVMs[12]. Οι γυναίκες έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης PAVMs από ότι οι άντρες και αυτό ίσως σχετίζεται με τις επιδράσεις των γυναικείων ορμονών στο αγγειακό σύστημα στην ΗΗΤ[11].

Τα PAVMs αποτελούν μια χαμηλής αντίστασης διαφυγή από τα δεξιά προς τα αριστερά. Συμπτώματα και ενδείξεις που σχετίζονται με PAVMs περιλαμβάνουν υποξαιμία, κυάνωση, μικρή αντοχή στην άσκηση και δύσπνοια. Τα συμπτώματα τείνουν να προοδεύουν στο 26% των ασθενών χωρίς θεραπευτική αγωγή και η θνησιμότητα από συμβάντα σχετιζόμενα με PAVM επέρχεται στο 11%[13]. Νευρολογικά συμπτώματα, όπως ημικρανικές κεφαλαλγίες, παροδικά ισχαιμικά επεισόδια, εγκεφαλικό, παροξυσμός και εγκεφαλικά αποστήματα, μπορούν να προκύψουν από μια δεξιά προς τα αριστερά διαφυγή ενός PAVM[10,11,15,16]. Η

δύσπνοια σχετίζεται με τον βαθμό της υποξαιμίας που προκύπτει από τα PAVMs, αλλά δεν σχετίζεται ακριβώς με τον συνολικό αριθμό των PAVMs ή με το κλάσμα διαφυγής[11,12]. Η ημικρανία είναι γνωστό πως σχετίζεται με την παρουσία ενδοκαρδιακών διαφυγών δεξιά προς τα αριστερά και η επίπτωση της φτάνει το 46% των ασθενών με HHT και PAVMs. Πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν παραδοξικό εμβολισμό και μειωμένη εκποίηση 5-HT(σεροτονίνης), η οποία φυσιολογικά μεταβολίζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των πνευμονικών τριχοειδών αγγείων[17].

Ο αιμοθώρακας και η αιμόπτυση, που οδηγούν στην νοσηλεία ή το θάνατο, συμβαίνουν στο 10% των ασθενών. Η πνευμονική αιμορραγία από ρήξη ενός PAVM είναι σπάνια, αλλά μπορεί να συμβεί τόσο στους ενήλικες όσο και στα παιδιά και είναι απειλητική για τη ζωή. Η συχνότητα των πνευμονικών συμπτωμάτων σχετίζεται σε ένα βαθμό με το μέγεθος της βλάβης και είναι μεγαλύτερη σε ασθενείς με ένα απλό PAVM μεγαλύτερο από 2cm σε διάμετρο, με μια τρεφόμενη αρτηρία μεγαλύτερη από 3mm σε διάμετρο ή με πολλαπλά PAVMs[12]. Τα PAVMs μπορεί να μένουν σταθερά με το χρόνο ή να αυξάνουν σε μέγεθος και έχουν την ροπή να μεγαλώνουν ιδιαίτερος στην εφηβεία και την εγκυμοσύνη εξαιτίας των ορμονικών επιδράσεων[12]. Μαζική αιμόπτυση και αιμοθώρακας έχουν παρατηρηθεί στο τρίτο τρίμηνο, γι' αυτό είναι σημαντικό να ελέγχουμε τις εγκύους με HHT για PAVMs και να αντιμετωπίζουμε όσα PAVMs έχουν σημαντικό μέγεθος πριν την εγκυμοσύνη ή στο δεύτερο τρίμηνο αν ανακαλυφθεί κατά την κύηση[11,12]. Ο αποκορεσμός που οφείλεται στη δεξιά προς αριστερά διαφυγή μπορεί να καλυφθεί από φυσιολογικούς παράγοντες κατά την εγκυμοσύνη[11].

Τα PAVMs εντοπίζονται κυρίως στους χαμηλότερους λοβούς[12]. Τα PAVMs μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως απλά, τα οποία παράγουν τον αρτηριακό τους εφοδιασμό από μια ή περισσότερες διακλαδώσεις μιας μόνο τμηματικής πνευμονικής αρτηρίας(90%) και σύνθετα, με αρτηριακό εφοδιασμό από πολλές τμηματικές πνευμονικές αρτηρίες(10%)[13]. Περίπου το 5% των ασθενών με HHT έχουν ένα πιο δριμύ και διαχεόμενο πρότυπο πνευμονικής ασθένειας που παρουσιάζεται με έλλειψη ανεκτικότητας στην άσκηση και έντονη κυάνωση. Σε αυτούς τους ασθενείς σχεδόν όλες οι τμηματικές αρτηρίες των χαμηλότερων λοβών έχουν PAVMs που προέρχονται από μικρές υποτμηματικές δικλαδώσεις[11]. Η συχνότητα των

νευρολογικών επιπλοκών είναι μεγαλύτερη σε αυτούς τους ασθενείς παρά σε αυτούς με PAVMs.

Τα PAVMs, αν είναι μεγάλα, εντοπίζονται με ακτινογραφία θώρακος ενώ μικρά ή διάχυτα PAVMs ίσως να μην είναι ορατά με CXR, και μερικά PAVMs μπορεί να είναι λιγότερο ευκρινή από την καρδιά ή το διάφραγμα (Εικόνα 2). Η αξονική τομογραφία είναι πιο ευαίσθητη από την ακτινογραφία για την ανίχνευση των PAVMs. Μια ακόμη διαδεδομένη μέθοδος ελέγχου ύπαρξης PAVM είναι η συγκριτική ηχοκαρδιογραφία, η οποία όμως δεν μπορεί να ποσοτικοποιήσει το μέγεθος της δεξιά-προς-τα-αριστερά διαφυγής[13,18]. Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών θα έχουν εντοπισμένη διαφυγή στην ηχοκαρδιογραφία, αλλά στην αξονική δεν θα εντοπίζεται κανένα PAVM. Αυτό θεωρείται πως οφείλεται στο μικρό μέγεθος του PAVM το οποίο και δεν εντοπίζεται[11]. Η παρουσία υποξυαιμίας μπορεί να είναι δείκτης παρουσίας ενός μεγάλου ή πολλαπλών PAVMs. Η επιδείνωση της υποξυαιμίας στη όρθια στάση είναι συνήθης σε HHT ασθενείς με παρουσία PAVMs και οφείλεται στην αυξανόμενη ροή αίματος υπό την επήρεια της βαρύτητας μέσω των διακλαδώσεων που βρίσκονται στη βάση των πνευμόνων[18]. Στα μικρά παιδιά η μέτρηση του κορεσμού οξυγόνου σε ύπτια και όρθια στάση μπορεί να είναι ένα πολύτιμο εργαλείο στον έλεγχο για μεγάλα PAVMs. Αν ο κορεσμός οξυγόνου είναι χαμηλός ή το παιδί δεν έχει την κατάλληλη ανάπτυξη ή δεν είναι ικανό να διατηρεί την ένταση του στον αθλητισμό θα πρέπει η ηχοκαρδιογραφία να γίνει νωρίς αλλιώς δεν επιχειρείται ως την ηλικία των 12[11].



Εικόνα 2: Αγγειογραφία του αριστερού κάτω λοβού ασθενούς με ΗΗΤ. Το μαύρο βέλος δείχνει την αρτηρία που τρέφει το σχηματιζόμενο PAVM, ενώ το άσπρο υποδεικνύει τη φλεβία (Από *M.F. Carette et al., 2009*).

- **Γαστρεντερική οδός**

Οι τηλαγγειεκτασίες της γαστρεντερικής οδού (gastrointestinal tract, GI, Εικόνα 3) έχουν πολύ σημαντική βαρύτητα αφού μπορούν να οδηγήσουν σε πολύ σοβαρά αιμορραγικά επεισόδια, κυρίως στην έκτη και έβδομη δεκαετία της ζωής. Οι αιμορραγίες αυτές συμβαίνουν στο 25-35% των ασθενών με ΗΗΤ και μπορούν να προκαλέσουν δριμεία αναιμία και υψηλές απαιτήσεις μετάγγισης αίματος[19,20]. Η υποδιαγνωσμένη ρινορραγία είναι πιο συνήθης αιτία σιδηροπενικής αναιμίας από ότι η αιμορραγία στη γαστρεντερική οδό[21]. Η αιμορραγία του GI στην ΗΗΤ μπορεί να είναι δύσκολο να αναγνωρισθεί καθώς πολλοί ασθενείς με ΗΗΤ παίρνουν επιπρόσθετο συμπλήρωμα σιδήρου το οποίο μπορεί να συμβάλλει σε μακροχρόνια κατάσταση σκούρων κοπράνων κάνοντας την αναγνώριση της μέλαινας δύσκολη. Επιπλέον, η ρινορραγία μπορεί να προκαλέσει κατάποση του αίματος το οποίο, εν συνεχεία, μιμείται την αιμορραγία του GI[19]. Οι τηλαγγειεκτασίες κατανέμονται σε ολόκληρη τη γαστρεντερική οδό, αλλά συνήθως εντοπίζονται στο στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο και τη νηστίδα[19]. Συνήθως είναι ίδιες σε μέγεθος και εμφάνιση με αυτές του ρινικού και στοματικού βλεννογόνου, αλλά παρουσιάζονται αρκετές φορές και μεγαλύτερα AVMs καθώς και αγγειοδυσπλασίες[21]. Οι τηλαγγειεκτασίες του γαστρεντερικού δεν είναι ορατές με κάποια απεικονιστική μέθοδο, ωστόσο

μεγαλύτερα AVMs μπορούν περιστασιακά να φανούν με αξονική τομογραφία ή αξονική αγγειογραφία[20,22]. Η ενδοσκοπία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην εύρεση τηλαγγειεκτασιών στην νηστίδα και τον ειλέο[19].



Εικόνα 3: Κλινική εικόνα της ΗΗΤ στη γαστρεντερική οδό. Στην εικόνα φαίνεται η αγγειοδυσπλασία στη γαστρική περιοχή του πυλωρού (Sadick et al, Wien Klim Wochenschrift, 2006).

- **Κεντρικό νευρικό σύστημα**

Οι νευρολογικές εκδηλώσεις στην ΗΗΤ περιλαμβάνουν εγκεφαλικά αποστήματα, παροδικό ισχαιμικό επεισόδιο, εγκεφαλικό, σπονδυλικό και εγκεφαλικό AVM (cerebral AVM, CAVM) (Εικόνα 4), παροξυσμό, ενδοκρανιακή αιμορραγία και ημικρανιακούς πονοκεφάλους[23]. Σε προηγούμενες επισκοπήσεις, οι νευρολογικές επιπλοκές αναφέρονται στο 8-12% των μελών των οικογενειών με ΗΗΤ. Αυτές οι καταστάσεις μπορεί να ξεκινάνε από πρωτοπαθείς αλλοιώσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα ή δευτερογενώς ως συνέπεια των πνευμονικών αγγειακών αλλοιώσεων. Τα 2/3 των περιστατικών με νευρολογικές εμπλοκές προέρχονται από δευτεροπαθείς επιπλοκές και μπορεί να προέρχονται από παραδοξικό εμβολισμό, δευτεροπαθή πολυκυτταραιμία ή συστηματική υποξία ως αποτέλεσμα της δεξιά προς αριστερά διαφυγής[23]. Οι ημικρανιακοί πονοκέφαλοι είναι το πιο κοινό σύμπτωμα καθώς εκδηλώνεται στο 50% των ασθενών με ΗΗΤ.

Παρόλο που η συσχέτιση των εγκεφαλικών αγγειακών δυσπλασιών (cerebral vascular malformations, CVMs) με την ΗΗΤ αναφέρεται στο 5-10% των περιστατικών, στην πραγματικότητα είναι υψηλότερη[24,25]. Η χρήση μαγνητικής τομογραφίας (MRI) εγκεφάλου ως μέθοδος ελέγχου στην ΗΗΤ ανίχνευσε CVMs στο 23% των περιστατικών και επιπλέον το 30-50% των ασθενών έχουν πολλαπλές αλλοιώσεις[25,26]. Τα CVMs κατηγοριοποιούνται, ανάλογα με την αγγειακή περιοχή που επηρεάζεται, σε ανευρύσματα, αρτηριοφλεβικές διαφυγές (CAVMs), τηλαγγειεκτασίες, φλεβικές δυσπλασίες (σηραγγώδες αιμαγγείωμα) και ανωμαλίες ανάπτυξης των φλεβών (φλεβικά αγγειώματα)[27].

Υπάρχουν τρεις τύποι CAVMs στην ΗΗΤ: τα μικρο-CAVMs, τα μικρά εστιακά CAVMs και τις συριγγώδεις αρτηριοφλεβικές διακλαδώσεις[28]. Με αριθμητικούς όρους, τα μικρο-CAVMs έχουν μέγεθος μικρότερο του 1 cm και αποτελούν το 40% των CAVMs στην ΗΗΤ, τα μικρά CAVMs με μέγεθος από 1 ως 3 cm και αποτελούν το 30% και το υπόλοιπο 30% αποτελείται από αρτηριοφλεβικά συρίγγια[25]. Η πλειονότητα των CAVMs εντοπίζεται στον εγκεφαλικό φλοιό και σπάνια εμπλέκει λευκή ουσία[25,28]. Αν και έχει ειπωθεί πως τα CAVMs μεγαλώνουν[26], κάτι τέτοιο δεν έχει παρατηρηθεί. Τα μικρο-CAVMs δεν γίνονται μακρο-CAVMs και τα CAVMs δεν εμφανίζονται μετά από κατάλληλο αρνητικό έλεγχο. Η πολλαπλότητα των CAVMs είναι αρκετά συχνή στην ΗΗΤ(>50%)[25,28]. Τα σπονδυλικά αρτηριοφλεβικά συρίγγια είναι συνήθως μεγάλα με υψηλό ρυθμό ροής μέσα από αυτά[25]. Η εύρεση σπονδυλικών ή εγκεφαλικών αρτηριοφλεβικών συριγγίων στα παιδιά είναι υπαινικτική για την ΗΗΤ[11]. Ο καλύτερος έλεγχος γίνεται με MRI ενισχυμένης αντίθεσης[26] και πολλοί έλεγχοι γίνονται με απλή MRI εγκεφάλου είτε με είτε χωρίς σκιαγραφικό. Το κυριότερο πρότυπο διάγνωσης των CAVMs θεωρείται η ψηφιακή αγγειογραφία αφαίρεσης (digital subtraction angiography, DSA). Αυτή η εξέταση επιτρέπει την ανάλυση της αρχιτεκτονικής των αγγείων των AVMs, απεικονίζοντας τις τρεφόμενες αρτηρίες, τις εστίες και τα σημεία διαφυγής, την παροχέτευση των αρτηριών, την αιμοδυναμική και πιθανές σχετικές αλλοιώσεις (αρτηριακά και φλεβικά ανευρύσματα) και δίνει ακριβείς πληροφορίες για το μέγεθος της βλάβης και την τοποθεσία της που είναι πολύ σημαντικά για το σχεδιασμό της αντιμετώπισης[24,25].



Η ανάπτυξη εγκεφαλικού αποστήματος είναι επίσης αυξημένη στους ασθενείς με ΗΗΤ με τα περιστατικά να κυμαίνονται από 5-9%[29]. Αυτό είναι περίπου 1000 φορές του κινδύνου ανάπτυξης μόλυνσης του CNS στο γενικό πληθυσμό[23]. Το εγκεφαλικό απόστημα κατά κύριο λόγο εμφανίζεται σε ηλικίες 30-50 ετών[23]. Οι κλινικές εκδηλώσεις διαφέρουν και επηρεάζονται από το μέγεθος και τη θέση της βλάβης, την παρουσία υποκείμενης ασθένειας του ξενιστή και της τοξικότητας του οργανισμού[30,31]. Κοινά κλινικά ευρήματα είναι ο πυρετός, ο πονοκέφαλος, η μεταβολή της πνευματικής κατάστασης, ο παροξυσμός, η ναυτία, ο έμετος, εστιακά νευρολογικά ελλείματα, οίδημα οπτικής θηλής, αταξία και αυχενική δυσκαμψία[32]. Ο σχηματισμός του εγκεφαλικού αποστήματος πιθανόν συμβαίνει ως αποτέλεσμα της παραδοξικής εμβολής στην οποία μια πνευμονική αρτηριοφλεβική επικοινωνία επιτρέπει στα έμβολα να παρακάμψει την λειτουργία φιλτραρίσματος της πνευμονικής τριχοειδούς κυκλοφορίας[23]. Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν[33]:

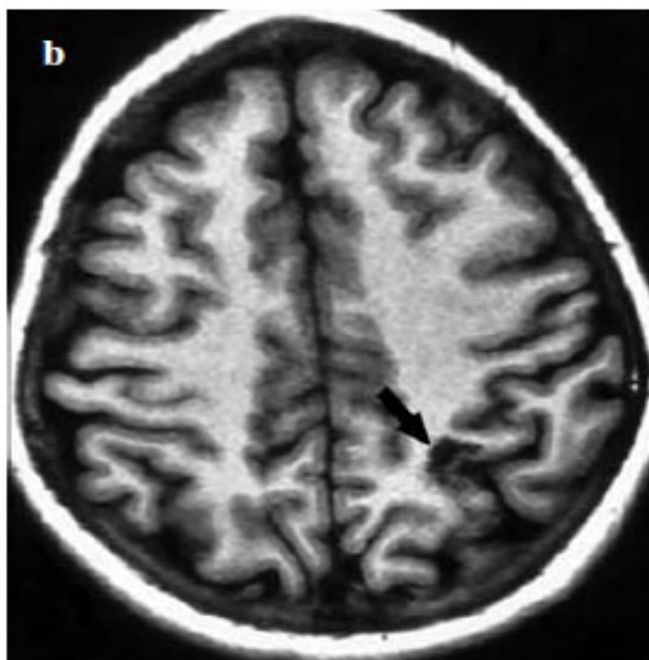
1. Υποξαιμία και πολυκυτταραιμία, που προκαλούν μειωμένη αντίσταση του εγκεφαλικού ιστού σε μόλυνση κατά την παροδική βακτηριαίμια.
2. Αποστειρωμένο έμβολο το οποίο οδηγεί σε εγκεφαλικό έμφραγμα το οποίο δευτερογενώς μολύνεται.

Στην περίοδο πριν τις αντιβιώσεις, το εγκεφαλικό απόστημα ήταν θανατηφόρο. Πρόσφατες εκτιμήσεις θνησιμότητας κυμαίνονται μεταξύ 0-8%[32]. Σε μια επισκόπηση του 1984 η θνησιμότητα των ασθενών με ΗΗΤ έφτανε το 39% ενώ σε μια επισκόπηση του 2008 είναι 19%[23]. Αυτή η μείωση του ποσοστού θνησιμότητας αποδίδεται στην βελτίωση των μεθόδων διάγνωσης και αντιμετώπισης. Η χρήση αξονικής και μαγνητικής τομογραφίας έχει καταστήσει δυνατή την ανίχνευση αποστημάτων σε πρώιμο στάδιο[34].

Οι κοίλες δυσπλασίες σπάνια σχετίζονται με την ΗΗΤ[29]. Κοινώς είναι γνωστές ως σηραγγώδη αγγειώματα και είναι φλεβικές, «δεξαμενές» αίματος. Οι κοίλες δυσπλασίες στην αξονική τομογραφία είναι κυκλικές και συχνά εμφανίζονται πολύ πυκνές με μια εμφάνιση «σύννεφου» που μιμείται ένα εγκεφαλικό αιμάτωμα. Στο 15% των περιπτώσεων, οι ασβεστοποιήσεις διαφόρων μορφολογιών φαίνονται περιφερειακά.

Τα φλεβικά αγγειώματα, που θεωρούνται αναπτυξιακές φλεβικές ανωμαλίες, χαρακτηρίζονται από φλεβικές διευρύνσεις, συνήθως με υποφλοιώδη εντοπισμό όταν απουσιάζει αρτηριακή διεύρυνση[24]. Κατά καιρούς, άλλες μικρές φλέβες μπορεί να συγκλίνουν προς το κύρια διακλάδωση, οδηγώντας σε μια εμφάνιση «κεφαλή της μέδουσας»[26]. Σε αυτές τις περιπτώσεις τόσο η αξονική όσο και η μαγνητική τομογραφία απεικονίζουν τις διεσταλμένες υποφλοιώδεις φλέβες με τη τυπική εμφάνιση «κεφαλή της μέδουσας»[24].

Νευρολογικά συμπτώματα, όπως ημικρανία, εγκεφαλικό, παροξυσμός και ενδοκρανιακή αιμορραγία είναι συνήθεις στην ΗΗΤ και συμβαίνουν στο 8-27% των περιστατικών[26]. Τα συμπτώματα στο 61% των ασθενών προέρχονται από εμβολικά γεγονότα μέσω PAVMs με το 28% να οφείλονται σε αιμορραγίες των CAVMs[26]. Οι περιβαλλόμενοι ιστοί μπορούν να πάθουν ισχαιμία από σπαστικότητα. Το 1/3 των ασθενών με εγκεφαλικά ή σπονδυλικά AVMs θα υποφέρουν από παροξυσμό, αιμορραγία ή παραπάρεση[26]. Η θνησιμότητα από ρήξη ενός CAVM σε ασθενείς που δεν πάσχουν από ΗΗΤ είναι 53-81%, οπότε και για τους ασθενείς με ΗΗΤ ισχύει κάτι αντίστοιχο.



Εικόνα 4: Εγκεφαλικό AVM σε ασθενή με ΗΗΤ(Από *Memeo et al, 2008*).

- **Ήπαρ**

Οι επιπλοκές του ήπατος στην ΗΗΤ χαρακτηρίζονται από εκτεταμένες διαχεόμενες ηπατικές αγγειακές δυσπλασίες (vascular malformations,, VMs) (Εικόνα 5) που, δεδομένου του διπλού εφοδιασμού αίματος του ήπατος, χωρίζονται σε 3 τύπους διαφυγών[35]:

1. Αρτηριοφλεβική (ηπατική αρτηρία προς ηπατική φλέβα)
2. Αρτηριοπυλαία (ηπατική αρτηρία προς πυλαία φλέβα)
3. Πυλαιοφλεβική (πυλαία φλέβα προς ηπατική φλέβα)

Ανατομικά, οι αγγειακές ανωμαλίες του ήπατος διαφέρουν ως προς το μέγεθος. Παρόλο που μακροσκοπικά AVMs φαίνονται ακτινολογικά, μικροσκοπικές μη φυσιολογικές άμεσες επικοινωνίες ανάμεσα σε αρτηρίδια και εκτατικά κολποειδή (αρτηριοφλεβικές διαφυγές) και ανάμεσα σε πυλαίες φλέβες και εκτατικά κολποειδή (πυλαιοφλεβικές διαφυγές) αποδεικνύονται ιστολογικά και με τρισδιάστατη ιστολογική ανακατασκευή ενός ήπατος ΗΗΤ[36,37]. Οι τρεις τύποι διαφυγών πιθανώς συμβαίνουν συνδυαστικά αλλά κατά κανόνα το ένα εξ αυτών επικρατεί λειτουργικά. Ο τύπος διαφυγής που επικρατεί είναι δυνατό να αλλάζει με το χρόνο[35]. Τα περιστατικά με ηπατική εμπλοκή στην ΗΗΤ εκτιμώνται στο 41-78%[38,39].



**Εικόνα 5: Ηπατική τηλαγγειεκτασία σε ασθενή με ΗΗΤ (Από *Agnollitto PM et al, 2013*).**

Τα συμπτώματα προκύπτουν στο 8% των ασθενών με ΗΗΤ και ηπατικά VMs[38] και εμφανίζονται κάπου στο 30<sup>ο</sup> έτος της ηλικίας και κυρίως σε γυναίκες[35]. Οι πιο κοινές κλινικές εκδηλώσεις είναι η καρδιακή ανεπάρκεια, η πυλαία υπέρταση και ασθένειες της χοληφόρου. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως αυτές οι εκδηλώσεις μπορεί να συμβούν συγχρόνως ή διαδοχικά και να έχουν αυθόρμητες επιδεινώσεις και υποχωρήσεις[35].

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι ως τώρα η πιο συνήθης αρχική κλινική εκδήλωση. Συμβαίνει κυρίως σε γυναίκες μέσης ηλικίας. Χαρακτηρίζεται από μείωση της αναπνοής, δύσπνοια κατά την άσκηση, ορθόπνοια, ασκίτες ή και οίδημα. Ένα ερέθισμα ή φύσημα στο επιγάστριο ή το δεξί πάνω τεταρτημόριο αναφέρεται στις μισές περιπτώσεις ασθενών αλλά μάλλον είναι πιο συχνό[35,40]. Αν και η καρδιακή παροχή αυξάνεται σε όλους τους ασθενείς με συμπτωτικά VMs ασχέτως του τύπου του VM που εκδηλώνεται, οι υψηλότερες τιμές εντοπίζονται σε αυτήν την ομάδα ασθενών καθώς πάνω από το 90% αυτών έχουν καρδιακή παροχή πάνω από 8L/min[37]. Η υψηλής παροχής καρδιακή ανεπάρκεια είναι αποτέλεσμα της διαφυγής του αίματος από την ηπατική αρτηρία ή/και την πυλαία φλέβα προς την συστηματική κυκλοφορία που σταδιακά οδηγεί σε υψηλής παροχής καρδιακή ανεπάρκεια[35].

Η πυλαία υπέρταση είναι η δεύτερη, πιο συνήθης εκδήλωση μετά την καρδιακή ανεπάρκεια[40]. Συμβαίνει εξίσου σε άντρες και γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας τα 62 έτη. Παρουσιάζεται κυρίως με ασκίτη αλλά και με κίρσους. Αυτά τα συμπτώματα με την παρουσία οζώδους ήπατος μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη διάγνωση περί κίρρωσης ήπατος, το οποίο και εξηγεί μια μη επαρκή αναφορά της εκδήλωσης αυτής στη βιβλιογραφία. Η κλίση των μετρήσεων της πυλαίας πίεσης από την φλεβική πίεση (HVPG) υποδεικνύουν κολποειδή τύπο πυλαίας υπέρτασης. Αξιοσημείωτο είναι πως αιμορραγίες από αρτηριοφλεβικές δυσπλασίες του γαστρεντερικού συμβαίνουν κυρίως σε ασθενείς με αυτή την παρουσίαση[40]. Η ανάπτυξη της πυλαίας υπέρτασης έχει δύο πιθανούς μηχανισμούς. Ο πρώτος και πιο εμφανής είναι μέσω της διαφυγής του αίματος από την ηπατική αρτηρία προς την πυλαία φλέβα. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι δευτερογενής της οξιδικής αναγεννητικής υπερπλασίας (nodular regenerative hyperplasia, NRH)[35].

Οι ασθένειες της χοληφόρου χαρακτηρίζονται από πόνο στο άνω δεξί τεταρτημόριο και χολόσταση με ή χωρίς χολαγγειίτιδα. Προσβάλλουν γυναίκες με μέση ηλικία τα 40 έτη. Απεικονιστικές μελέτες δείχνουν ενδοηπατικές ή εξωηπατικές στενώσεις της χοληφόρου, διευρύνσεις ή και κύστες της χολής σε όλους τους ασθενείς. Συχνά υπάρχει λανθασμένη διάγνωση χολοκυστίτιδας επειδή εκεί οδηγεί η παρουσία του πόνου του δεξιού άνω τεταρτημορίου και τεστ ηπατικών ανωμαλιών. Σε ακραίες καταστάσεις η ισχαιμία της χοληφόρου μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση του πόρου της χολής και σε ηπατική νέκρωση. Το πρόβλημα της χοληφόρου οφείλεται σε ισχαιμία της χοληφόρου. Η παροχή αίματος στο χοληφόρο δέντρο γίνεται μέσω της ηπατικής αρτηρίας και η διαφυγή του αίματος από την ηπατική αρτηρία προς την πυλαία ή και την ηπατική φλέβα θα προκαλέσει ισχαιμία ή και νέκρωση της χοληφόρου με κύστες[35].

Η εγκεφαλοπάθεια οφειλόμενη σε πυλαιοηπατική διαφυγή είναι λιγότερο συνήθης καθώς ελάχιστα είναι τα περιστατικά, στα οποία αναφέρονται με αυτό το σύμπτωμα[36,41,42]. Η εγκεφαλοπάθεια είναι αποτέλεσμα της διαφυγής από την πυλαία φλέβα προς την ηπατική φλέβα και την συστηματική κυκλοφορία και αντιστοιχεί στον πρόσφατα ορισμένο τύπο Β εγκεφαλοπάθειας[43]. Ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι το ότι σε ασθενείς με ΗΗΤ και ηπατικό πρόβλημα, χωρίς εμφανή PSE, έχουν περιγραφεί μια υπερπυκνότητα των βασικών γαγγλίων και της ωχρής σφαίρας μέσω MRI[44,45], ευρήματα που είναι συνήθη στην ηπατική εγκεφαλοπάθεια και καταδεικνύουν ένα κοινό ρόλο για την πυλαιοσυστημική διαφυγή στην παθογένεση τους[35].

Σε ασθενείς που δεν είναι γνωστό αν πάσχουν από ΗΗΤ, η προσβολή του ήπατος ενισχύει την διάγνωση. Ατομικό ιστορικό ή και οικογενειακό ρινορραγιών, τηλαγγειεκτασιών, καρδιακής ανεπάρκειας, εγκεφαλικών αγγειακών συμβαμάτων, αποστήματα ή ασθένειες του ήπατος με «κίρρωση» ή χολαγγειίτιδα αυξάνουν την υπόνοια ΗΗΤ και ηπατικών VMs. Σε ασθενείς που πάσχουν από ΗΗΤ, η παρουσία αναπνευστικής ανεπάρκειας ή οιδήματος, ενώ δεν υπάρχει PAVM ή αναιμία, ή η παρουσία ασκίτου, κισμών οισοφάγου, κοιλιακού πόνου, εγκεφαλοπάθειας ή χολαγγειίτιδας πρέπει να αυξάνουν την υπόνοια της προσβολής του ήπατος[35]. Εφόσον υπάρχει αυξημένη υπόνοια, η οριστική διάγνωση της προσβολής του ήπατος γίνεται με απεικονιστικές μεθόδους. Τα χαρακτηριστικά ευρήματα είναι ενδοηπατική υπεραγγείωση (ή τηλαγγειεκτασίες) και διεύρυνση της κοινής ηπατικής αρτηρίας. Οι

ανωμαλίες αυτές δείχνονται αγγειογραφικά[40], με υπερηχογραφία Doppler[46,47], με ελικοειδή και multiphase αξονική τομογραφία[48,49] και με μαγνητική τομογραφία[50]. Η αγγειογραφία είναι η κύρια μέθοδος διάγνωσης ηπατικών VMs και πιθανόν η καλύτερη μέθοδος ανίχνευσης δυσδιάκριτων ανωμαλιών, όπως οι πυλαιοφλεβικές διαφυγές[51]. Στην αξονική τομογραφία οι ασθενείς έχουν διάχυτες ηπατικές τηλαγγειεκτασίες που οδηγούν σε αξιοσημείωτα ετερογενή πρότυπα ηπατικής ενίσχυσης και μια αξιοσημείωτα διατεταμένη αρτηρία. Ο τύπος της διαφυγής μπορεί να διευκρινιστεί σε πάνω από τα 2/3 των ασθενών αναζητώντας πρώιμες ή διαφορικές ενισχύσεις της ηπατικής φλέβας ή της πυλαίας φλέβας κατά τη διάρκεια διαφόρων φάσεων απεικόνισης[48]. Αν και η αρτηριοπυλαία διαφυγή υπάρχει πολύ πιο συχνά, δεν υπάρχει καμία πραγματική συσχέτιση ανάμεσα στα ευρήματα της αξονικής και την κλινική εικόνα[35,48]. Η απεικόνιση των ανωμαλιών των χοληφόρων είναι πιο διαδεδομένη σε συμπτωματικούς ασθενείς παρά σε μη συμπτωματικούς, καταδεικνύοντας πως η ανάπτυξη των ανωμαλιών των χοληφόρων συμβαίνει αργότερα κατά την ανάπτυξη της ασθένειας σε χρόνο, στον οποίο ο βαθμός της διαφυγής και η ισχαιμία των χοληφόρων μπορεί να είναι μεγαλύτερα[35,48]. Η παρακάτω εικόνα δείχνει την προσβολή του ήπατος στην HHT.

### **1.1.3 Διαγνωστικά κριτήρια για την HHT**

Η κλινική διάγνωση της HHT με βάση την κλασική τριάδα της ρινορραγίας, τηλαγγειεκτασίας και ενός κατάλληλου οικογενειακού ιστορικού είναι σχετικά απλή, αλλά αυτό εξηγεί την αιτία μόνο σε μια μερίδα των περιπτώσεων στον πληθυσμό. Σήμερα η διάγνωση της HHT μπορεί να διαπιστωθεί με μόνο δύο από τις τέσσερις εκδηλώσεις: ρινορραγία, τηλαγγειεκτασία, οικογενειακό ιστορικό και αγγειακές βλάβες (AVMs)[52]. Εντούτοις, η σημαντικότητα των δυσδιάκριτων εκδηλώσεων της ασθένειας συχνά παραβλέπεται. Αντιστρόφως, μέσα σε οικογένειες με HHT υπάρχει κίνδυνος υπερδιάγνωσης, δεδομένου πως ένα άτομο μπορεί να διαγνωστεί ως προσβεβλημένο με βάση μόνο την ρινορραγία ή από μια λανθασμένη ερμηνεία των δερματικών αγγειακών βλαβών, δημιουργώντας προβλήματα στην κλινική αντιμετώπιση και στην ερευνητική προσπάθεια. Γι' αυτό το Scientific Advisory Board του HHT Foundation International Inc. έδωσε τα διαγνωστικά κριτήρια Curacao για την HHT τα οποία και παρατίθενται στον πίνακα 2, παρακάτω[53]:

ΚΡΙΤΗΡΙΑ	
1. Ρινορραγία	Σποραδικές επαναλαμβανόμενες αιμορραγίες της μύτης
2. Τηλαγγειεκτασίες	Πολλαπλές, σε χαρακτηριστικά σημεία:  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Χείλη</li> <li>- Στοματική κοιλότητα</li> <li>- Δάχτυλα</li> <li>- Μύτη</li> </ul>
3. Αγγειακές βλάβες	Όπως:  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Γαστρεντερικές τηλαγγειεκτασίες</li> <li>- PAMs</li> <li>- CAVMs</li> <li>- Spinal AVMs</li> </ul>
4. Οικογενειακό ιστορικό	Ένας συγγενής πρώτου βαθμού σύμφωνα με αυτά τα κριτήρια

**Πίνακας 2:** Τα κατά Curaçao διαγνωστικά κριτήρια τα οποία χρησιμοποιούνται για την κλινική διάγνωση εμφάνισης της ΗΗΤ σε ασθενείς. Προκειμένου ένα άτομο να θεωρηθεί κλινικά ασθενής θα πρέπει να παρουσιάζει τα τρία από τα τέσσερα κριτήρια του πίνακα. Εάν μόνο δύο από τα κριτήρια είναι παρόντα, τότε το άτομο θεωρείται πιθανόν προσβεβλημένο. Η ύπαρξη ενός μόνο εκ των τεσσάρων κριτηρίων αποκλείει την ύπαρξη της ΗΗΤ.

Βάσει αυτών των κριτηρίων η διάγνωση της ΗΗΤ είναι:

- Θετική, αν 3 κριτήρια παρουσιάζονται
- Πιθανή ή υπονοούμενη, αν 2 κριτήρια παρουσιάζονται και
- Απίθανη, αν παρουσιάζονται λιγότερα από 2 κριτήρια.

#### **1.1.4 Αντιμετώπιση της ΗΗΤ**

Όταν επιλέγουμε θεραπεία για την ΗΗΤ, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το ισοζύγιο ανάμεσα στις ωφέλειες και τους κινδύνους του ασθενούς. Για την αντιμετώπιση της ρινορραγίας διάφοροι θεραπευτικές μέθοδοι είναι διαθέσιμες. Αυτές περιλαμβάνουν την άμεση επιστοίβαση της μύτης, χειρουργείο διαφραγματικής δερμοπλαστικής, τοπική και στοματική χορήγηση οιστρογόνων, αγγειακή καυτηρίαση και χειρουργική με λέιζερ[54]. Ο καυτηριασμός είναι προτιμότερο να αποφεύγεται εξαιτίας ζημίας των επαναπτυσσόμενων ρινικών αγγείων. Η μοναδική αντιαμορραγική θεραπεία, η οποία στηρίζεται πειραματικά αποδεδειγμένα, είναι η χρήση γυναικείων ορμονών, όπως, για παράδειγμα, 50 μg αιθυλικής οιστραδιόλης και 1 mg νορεθιστερόνης[54]. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν επαναλαμβανόμενες θεραπείες με λέιζερ. Το χειρουργείο έχει περιορισμένη επιτυχία λόγω της επανεμφάνισης της ρινορραγίας και εφαρμόζεται μόνο για επείγουσα θεραπεία της αιμορραγίας[54].

Για τα PAVMs, πριν το 1980, η μόνη μέθοδος θεραπείας ήταν η χειρουργική. Στις περισσότερες περιπτώσεις εκτελούνταν αφαίρεση της βλάβης και τελικοτελική αναστόμωση, τοπική εκτομή, εκτομή τμημάτων, λοβοεκτομή και πνευμονεκτομή[20]. Η χειρουργική εκτομή μπορεί να είναι ακόμα σημαντική σε ασθενείς στους οποίους η δεξιά προς αριστερά διαφυγή εμμένει μετά από το εμβολισμό όλων των εφικτών αγγείων[55], ή αν ένας ασθενής έχει βαρεία αλλεργική αντίδραση, αποκλείοντας την δυνατότητα εκτέλεσης της τεχνικής της αγγειογραφίας. Η θεραπεία του σχηματισμού εμβόλου περιγράφηκε από τον Postmann το 1977, φράσσοντας τις θρεφόμενες αρτηρίες προς τα PAVMs[55]. Τα PAVMs εντοπίζονται με εκλεκτική πνευμονική αγγειογραφία: αποκολλησίμα μπαλόνια ή ανοξειδωτά πηνία χάλυβα αναπτύσσονται κοντά στο λαιμό του PAVM έως η ροή αίματος στο PAVM να διακοπεί[12,13,15,16]. Πιο πρόσφατα, χρησιμοποιούνται επίσης έμβολα Amplatzer για την εμβολή του PAVM[56,57], αν και υπάρχουν επιφυλάξεις σχετικά με τους κινδύνους εμβολισμού των μικρών τριχοειδών κατά την διάρκεια εμβολισμού των μεγάλων αγγείων[58]. Η διατήρηση ενός PAVM μετά την εμβολή μπορεί να οφείλεται είτε σε επανασυραγγοποίηση του αγγείου, που εμβολίστηκε, είτε στην ανάπτυξη παράπλευρης κυκλοφορίας[12,18,59,60].



Για την αντιμετώπιση των GI τελαγγεκτασιών χρησιμοποιούνται διάφορες φαρμακευτικές θεραπείες όπως συνδυασμό αιθυνλικής οιστραδιόλης με νορεθιστερόνη, δαναζόλη και αμινοκαπροϊκό οξύ, το οποίο αναστέλλει την ινωδόλυση, ενώ επίσης χρησιμοποιούνται λέιζερ και καυτηριασμός των τηλαγγειεκτασιών[19]. Οι περισσότεροι ασθενείς λαμβάνουν στοματικά θεραπεία σιδήρου και αν είναι απαραίτητο και αν χρειαστεί κάνουν μεταγγίσεις αίματος. Ο εμπλουτισμός της τροφής με σίδηρο είναι αποτελεσματικός για πολλούς ασθενείς με ΗΗΤ ενώ μερικά περιστατικά απαιτούν μετάγγιση[54].

Οι θεραπευτικές επιλογές για τα CVMs εξαρτάται από το μέγεθος και την αγγειακή αρχιτεκτονική της δυσπλασίας, την τοποθεσία της και τα συμπτώματα της. Μεγάλες βλάβες, ειδικά αυτές με υψηλή ροή, απαιτούν αντιμετώπιση και συνίσταται η ενδοαγγειακή εμβολή ως πολύτιμη εναλλακτική θεραπεία της χειρουργικής εκτομής ή της ραδιοθεραπείας[24]. Ο έλεγχος για τα CAVMs είναι αμφιλεγόμενος και εφαρμόζεται μόνο αν η επέμβαση βελτιώνει σημαντικά την νοσηρότητα. Ενώ η χειρουργική αφαίρεση μικρών επιφανειακών AVMs έχει ποσοστό θεραπείας 94-100% με θνησιμότητα κοντά στο 0%, η θνησιμότητα από χειρουργική εκτομή των μεσεγκεφαλικών AVMs φτάνει και το 20%. Η εστιασμένη ραδιοθεραπεία έχει ποσοστό θεραπείας 65-80% με 3% θνησιμότητα, ενώ η θνησιμότητα από ενδοαγγειακές απόφραξεις των CAVMs προσεγγίζουν το 6%. Πολλές από αυτές τις αντιμετώπισεις μπορεί να μην εξαλείψουν εντελώς τα CAVMs ή και να μην έχουν κανένα αποτέλεσμα στην μείωση του κινδύνου για τον ασθενή[11]. Η αντιμετώπιση του εγκεφαλικού αποστήματος συχνά απαιτεί ένα συνδυασμό φαρμακευτικής και χειρουργικής προσέγγισης. Για την αντιμετώπιση οι συστάσεις περιλαμβάνουν χειρουργικές παροχετεύσεις για βλάβες μεγαλύτερες από 2,5 cm σε διάμετρο δύο φορές την εβδομάδα απεικόνιση με CT και MRI και 6-8 εβδομάδες IV αντιβιοτικών. Μη επεμβατικές θεραπείες είναι αποτελεσματικές σε κάποιες περιπτώσεις αλλά αυτή η προσέγγιση θα πρέπει να επιλέγεται για ασθενείς με βλάβες μη προσβάσιμες χειρουργικά, για άτομα που δεν έχουν δυνατότητα χειρουργείου ή για μικρές βλάβες σε περιοχές καλά αγγειωμένες που έχουν υψηλή απόκριση μόνο σε αντιβιοτικά[23].

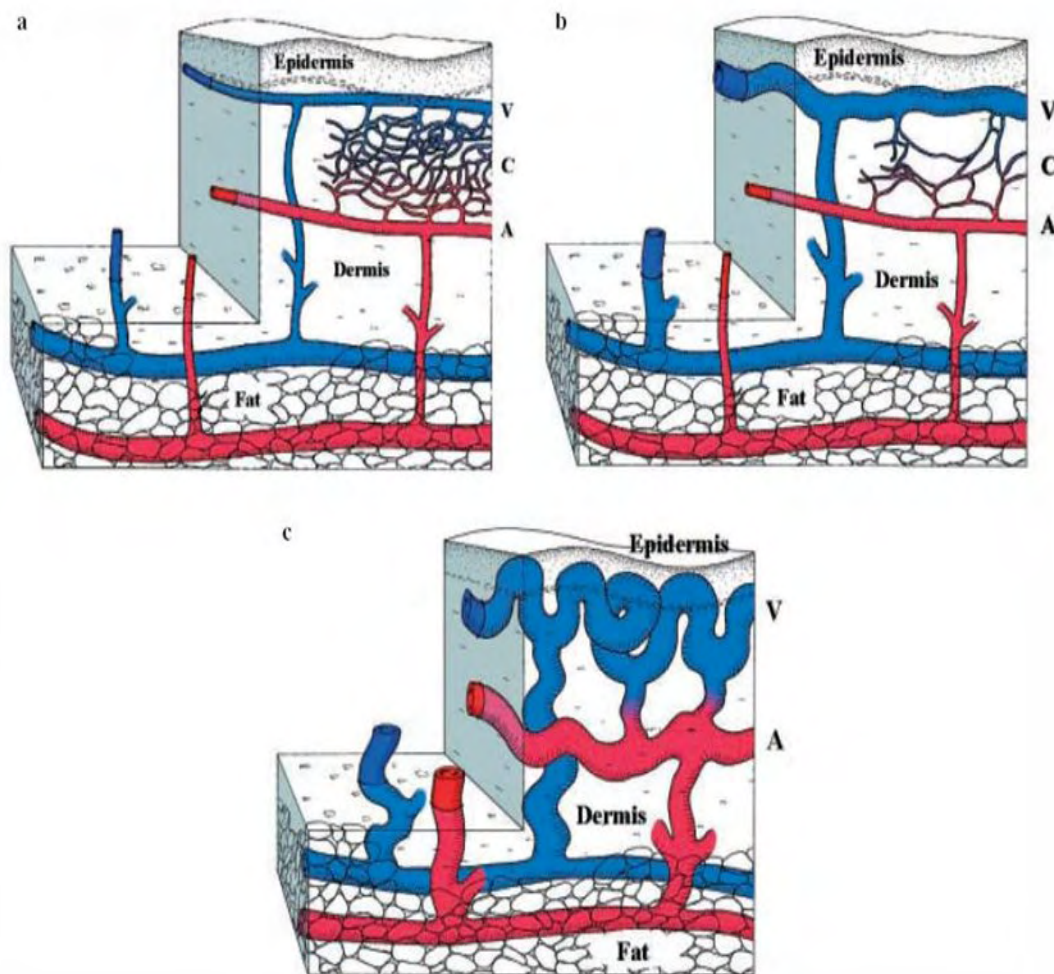
Στους ασθενείς με ΗΗΤ, που δεν έχουν συμπτώματα στο ήπαρ δεν συνίσταται θεραπεία για το ήπαρ. Για αυτούς που έχουν συμπτώματα η θεραπεία χωρίζεται σε θεραπεία συμπτωμάτων συγκεκριμένων επιπλοκών, θεραπεία που στοχεύει στην μείωση της διαφυγής και μεταμόσχευση ήπατος[35]. Η θεραπεία της καρδιακής

ανεπάρκειας και των επιπλοκών της πυλαίας υπέρτασης είναι η ίδια με αυτή, που δίνεται και για άλλες αιτιολογίες. Ο κοιλιακός πόνος από την ισχαιμία των χοληφόρων θεραπεύεται με αναλγητικά με την προσθήκη συστηματικών αντιβιοτικών, όταν συνδυάζεται με χολαγγειίτιδα. Επίσης μπορεί να χορηγηθεί urosdeoxycholic acid, παρόλο που δεν υπάρχει ένδειξη ωφέλιμης δράσης[35]. Η μεταμόσχευση ήπατος ενδείκνυται σε ασθενείς με ισχαιμική νέκρωση των χοληφόρων και σε αυτούς που έχουν καρδιακή ανεπάρκεια ή πυλαία υπέρταση αλλά δεν αποκρίνονται σε άλλες θεραπείες[59], αν και έχει προταθεί πως είναι η μόνη οριστική θεραπεία για την προσβολή του ήπατος στην ΗΗΤ[35]. Έως και σήμερα δεν έχουν αποσαφηνιστεί τα κριτήρια για τον προσδιορισμό του κατάλληλου χρόνου μεταμόσχευσης[35,59].

### **1.1.5 Παθολογική ανατομία**

Η βάση των κλινικών συμπτωμάτων στην ΗΗΤ οφείλεται σε ανωμαλίες της αγγειακής δομής οι οποίες αποτελούνται από άμεσες αρτηριοφλεβικές συνδέσεις μέσω ανευρυσμάτων με λεπτά τείχη και κυμαίνονται από μικρές τηλαγγειεκτασίες ως τις μεγαλύτερες σπλαγγινικές αρτηριοφλεβικές δυσμορφίες (arteriovenous malformations, AVMs)[60].

Οι πρώιμες μορφολογικές αλλαγές κατά την παθογένεση της ΗΗΤ φαίνεται να είναι εστιακές διατάσεις των μετατριχοειδικών αγγείων, που συχνά περιβάλλονται από διήθηση μονοπύρηνων. Καθώς τα φλεβίδια αυξάνουν σε μέγεθος, τόσο ως προς την εσωτερική τους κοιλότητα, όσο και το αγγειακό τους τοίχωμα, περιελίσσονται και συνδέονται με τα μεγεθυμένα αρτιρίδια μέσω των τριχοειδικών τμημάτων[61]. Σταδιακά αυτά τα τμήματα εξαφανίζονται οδηγώντας στο σχηματισμό μιας άμεσης αρτηριοφλεβικής επικοινωνίας (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Ανάπτυξη της τηλαγγειεκτασίας στην περιοχή του δέρματος και του βλεννογόνου. α) Φυσιολογικά αρτηρίδια (A) στο χορίο συνδέονται με φλεβίδια (V) μέσω πολλαπλών τριχοειδών (C). β) Στο πρώιμο στάδιο της τηλαγγειεκτασίας, το τριχοειδές δίκτυο (C) γίνεται όλο και περισσότερο σπάνιο με την ανάπτυξη των διογκομένων φλεβιδίων τα οποία είναι ακόμα συνδεδεμένα με τα αρτηρίδια μέσω ενός ή περισσότερων τριχοειδών. γ) Σε μια πλήρως ανεπτυγμένη τηλαγγειεκτασία τα φλεβίδια και οι διακλαδώσεις τους γίνονται αξιοπρόσεκτα διογκομένα, επιμηκημένα και περιελιγμένα. Τα αρτηρίδια επίσης διευρύνονται και επικοινωνούν άμεσα με τα φλεβίδια χωρίς μεσολάβηση των τριχοειδών. (Από *Sadick et al, 2006*)

Στην πλήρως ανεπτυγμένη τηλαγγειεκτασία, τα περισσότερα φλεβίδια δείχνουν υπερβολικά στρώματα λείων μυϊκών κυττάρων χωρίς ελαστικές ίνες ή έχουν ένα μη ολοκληρωμένο στρώμα λείων μυϊκών κυττάρων[61]. Οι περισσότερες από τις τηλαγγειεκτασίες εμφανίζονται στο στοματικό, το ρινικό και τον γαστρεντερικό βλενογόνο, ενώ τα AVMS κυρίως στους πνεύμονες, το ήπαρ και το κεντρικό νευρικό σύστημα[60].

Οι μικρότερες HHT δερματικές τηλαγγειεκτατικές βλάβες φαίνεται να είναι μια εστιακή διεύρυνση του μετά τριχοειδούς φλεβιδίου στον ανώτερο οριζόντιο πλέγμα. Τα διευρυμένα μετά τριχοειδή φλεβίδια μεγαλώνουν, συνδέονται με τα διευρυμένα αρτηρίδια με εξαφάνιση του ενδιάμεσου τριχοειδούς δικτύου, και σχηματίζουν αρτηριοφλεβικές συνδέσεις, σχετιζόμενες με λεμφοκυτταρικά περιαγγειακά διηθημένα κύτταρα. Μικροσκοπικές τηλαγγειεκτασίες δεν παρατηρούνται μόνο στο δέρμα αλλά και σε άλλα αγγειακά στρώματα όπως της πνευμονικής κυκλοφορίας, όπου είναι η κύρια αιτία της χαμηλού βαθμού ενδοπνευμονικής δεξιάς προς αριστερά διαφυγής[61].

Τα μεγάλα AVM υποτίθεται ότι προέρχονται από αυτές τις μικρότερες αλλοιώσεις μέσω προοδευτικής αγγειακής ανακατασκευής. Οι συγκρίσεις μεταξύ διαφόρων ειδών υποδεικνύει, προκειμένου να στηρίξουν τα αγγεία την αρτηριακή πίεση, ότι υπάρχει μια όψιμη συσχέτιση πάχους αγγειακού τοιχώματος σε σχέση με την ακτίνα του αυλού για να ελαχιστοποιήσει την πίεση στο τοίχωμα. Όταν οι φλέβες του ανθρώπου μεταπηδούν σε αρτηριακές συνθήκες, φυσιολογικά επακολουθεί προσαρμογή σε αυτή τη συσχέτιση, συνοδευόμενη από την αύξηση του πάχους του τοιχώματος. Στην HHT, ωστόσο, δεν παρατηρείται η υπόθεση ενός πιο αρτηριακού φαινοτύπου ως επακόλουθο της αρτηριοφλεβικής σύνδεσης. Τα αγγεία στα AVM, καθώς και οι διοχετευμένες φλέβες (draining veins), χαρακτηρίζονται από διεύρυνση με τοιχώματα διαφόρων βαθμών πάχους ακόμη και πάνω από σχετικά μικρά τμήματα και αποδιοργανωμένο χιτώνα. Η μέση αραίωση είναι φανερή, αν και επίσης επιφανείς είναι οι περιοχές της εστιακής πύκνωσης με άφθονο ιστό ελαστίνης και μια ποικίλη κατανομή των λείων μυϊκών κυττάρων. Έτσι, παρά την αιμάτωση στην αρτηριακή πίεση, τα αγγεία αμέσως μετά την αρτηριοφλεβώδη επικοινωνία διατηρούν την φλεβική κατασκευή των τοιχωμάτων τους.

Οι γονιδιακές μεταλλάξεις υποδεικνύουν πως η μη φυσιολογική σηματοδότηση της ενδογλίνης, του *ALK1* ή του *SMAD4* είναι υπεύθυνη για την ΗΗΤ. Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια επιβεβαιώνουν ότι οι μεταλλάξεις που προκαλούν την ΗΗΤ, αφού μερικά ποντίκια φέρουν ένα φυσιολογικό και ένα ανενεργό αντίγραφο ενός εκ των τριών γονιδίων εμφανίζουν χαρακτηριστικά της ΗΗΤ.

Το γενικό πλαίσιο στο οποίο αυτές οι γονιδιακές μεταλλάξεις είναι επιβλαβείς, ενώ για τα περισσότερα αγγεία η λειτουργικότητα είναι προφανώς φυσιολογική, έχει αποδειχτεί δελεαστικό. Το κάπως απλοϊκό περιεχόμενο ενός σωματικού “δεύτερου χτυπήματος”, δια του οποίου το εναπομείναν αλληλίο χάθηκε μέσα σε ένα κλώνο κυττάρων, μοιάζει πάντα απίθανο στη θέα της πολυπλοκότητας των τηλαγγειεκτατικών εστιών και ενδείξεων πως τα AVM σε ΗΗΤ ασθενείς ακόμη εκφράζουν το ίδιο επίπεδο ενδογλίνης όπως τα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα στους ίδιους ΗΗΤ ασθενείς. Μεγάλης κλίμακας μελέτες δεν έχουν παρουσιαστεί, αλλά μέχρι τώρα θεωρείται ότι στις περισσότερες, αν όχι σε όλες τις περιπτώσεις, η ΗΗΤ προέρχεται από την απλοανεπάρκεια της ενδογλίνης ή του *ALK1*, που είναι ότι αυτό το αγρίου τύπου εναπομείναν αλληλίο είναι ανίκανο να συνεισφέρει αποτελεσματική πρωτεΐνη για φυσιολογική λειτουργία. Παρόλα αυτά, αφού ακόμα και μέσα στα προσβεβλημένα αγγειακά τοιχώματα στην ΗΗΤ, η μεγαλύτερη πλειονότητα των αγγείων φέρεται να αναπτύσσεται και να λειτουργεί φυσιολογικά, απαιτούνταν η πάρελξη της εξαρτώμενης από το ευρύτερο πλαίσιο της ενδογλίνης και του *ALK1* που οφείλονται στην απλοανεπάρκεια. Οι προτάσεις πως η θεραπεία των πληγών ή η αγγειογένεση μπορεί να είναι η επιπλέον πρόκληση δεν είναι καινούρια, αλλά άρθρα που δημοσιεύτηκαν πρόσφατα δεν αποσαφηνίζουν πως για το πώς αυτός ο ενδο-ατομικός ή ένδο-οικογενειακός πολυμορφισμός μπορεί να εξηγηθεί.

Τα τελευταία χρόνια, μοντέλα πειραματόζωων επέτρεψαν μια πιο ξεκάθαρη ανάλυση των μηχανισμών μέσω των οποίων οι μεταλλάξεις στα γονίδια της ενδογλίνης και του *ACVRL1* οδηγούν σε ανώμαλη αγγειακή λειτουργία στην ΗΗΤ. Αυτά τα μοντέλα συμπεριλαμβάνουν: κλασικά απενεργοποιημένα ποντίκια· ετερόζυγα ποντίκια τα οποία αναπτύσσουν άστατες, αλλά περισσότερο σχετιζόμενα με την ΗΗΤ, χαρακτηριστικά περιλαμβάνοντας ρινορραγίες, τηλαγγειεκτασία, διεσταλμένα αγγεία και αρτηριοφλεβώδεις ανωμαλίες και κατά κάποιο τρόπο αποτελούν το πιο κατάλληλο μοντέλο για την ανθρώπινη ΗΗΤ· ειδικά knock out ενδοθηλιακά κύτταρα· και ποντίκια υπό συνθήκη επίδρασης LoxP με knock out

αλληλία που για το *ACVRL1/ALK1* επιφέρουν ένα μοντέλο στο οποίο συμβαίνουν αγγειακές ανωμαλίες όπως στην HHT με ένα σύμφωνο και προβλέψιμο τρόπο. Όπως και στον άνθρωπο, τα AVM στα ποντίκια εμφανίζουν φλεβικές δομές τοιχωμάτων και φλεβικά μοριακά χαρακτηριστικά.

Τα τελευταία δεδομένα προτείνουν πως οι μεταλλάξεις στην HHT μπορεί να είναι επιβλαβείς κυριαρχικά κατά τη διάρκεια κάποιων σχηματισμών της αγγειογένεσης, με συγκεκριμένες επιδράσεις στη σταθερότητα των πρόσφατα σχηματισθέντων αγγειακών βλαστών. Κατά την αγγειογένεση, σύντομες περίοδοι ενεργοποίησης, πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων συντονίζονται με την ελεγχόμενη αποσύνδεση των περιβαλλόμενων τοιχωματικών κυττάρων, που είναι περικύτταρα ή λεία μυϊκά κύτταρα, την πρωτεολυτική αναδόμηση της βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας μήτρας και την έκφραση παραγόντων επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Προαγγειογεννητικοί παράγοντες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF/VEGF-A), ρυθμίζουν διαφορετικά ορισμένους υποπληθυσμούς ενδοθηλιακών κυττάρων στους αγγειακούς βλαστούς, ελέγχοντας ανεξάρτητα την ενδοθηλιακή μετανάστευση σε ειδικευμένα κύτταρα και τον πολλαπλασιασμό στο βλαστό. Τα τοιχωματικά κύτταρα τότε επιστρατεύονται να σταθεροποιήσουν τα γεννώμενα αιμοφόρα αγγεία με το TGF-β1 να εμπλέκεται δυναμικά στη διαδικασία σταθεροποίησης.

Οι σύγχρονες έννοιες κλειδιά για την δημιουργία των AVM στην HHT είναι:

- Η ανάπτυξη των AVM εν μέρει συμβαίνει ως επακόλουθο της ενεργοποίησης των ήρεμων ενδοθηλιακών κυττάρων για παράδειγμα στον τραυματισμό ή/και στην αγγειογέννηση.
- Στη έναρξη της HHT και μιας διέγερσης της αγγειογένεσης παρατηρείται εκτεταμένος πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, εκτεταμένη ανάπτυξη των αγγείων, μαζί με συνοδό σχηματισμό των AVM σε ποντίκια ανεπαρκή σε *ENG<sup>+/-</sup>* και *ALK1*.
- Οι μεταλλάξεις στην HHT, τόσο στην ενδογλίνη όσο και στον *ALK1*, εμποδίζουν την επιστράτευση των τοιχωματικών κυττάρων στα αγγεία, τουλάχιστο εν μέρει. Η ενδογενής φωσφορύλιωση της *SMAD* στα

τοιχωματικά κύτταρα μειώνεται, αλλά μπορεί να ανακτηθεί από εξωγενώς χορηγούμενο προσδέτη η ενεργοποίηση του υποδοχέα.

- Η εξειδίκευση των αγγειακών στρωμάτων στο σχηματισμό των αγγείων στην ΗΗΤ μπορεί να αντανακλά διαφορικά βασικά επίπεδα έκφρασης ενδογλίνης και *ALK1*: δυναμική απορύθμιση της ενδογλίνης και του *ALK1*, όπως για παράδειγμα στην έναρξη της φλεγμονής, διαφορετικές απαιτήσεις για την αγγειογένεση ή/και διαφορετική δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου οι οποίες προκαλούν αγγειακή βλάβη. Η ενδογλίνη επικοινωνεί με το σύμπλοκο eNOS/hsp 90 στα ποντίκια με *ENG<sup>+/-</sup>*, η δραστηριότητα της eNOS μένει άζευκτη, αυξάνοντας έτσι τις δραστικές μορφές οξυγόνου που εξαρτώνται από την eNOS.

## 1.2) Γενετική και μοριακή βάση της ΗΗΤ

Η κληρονομική αιμορραγική τελαγγειεκτασία (ORW) είναι μια γενετικά ετερογενής διαταραχή η οποία κληρονομείται ως αυτοσωμικό επικρατές γνώρισμα[64]. Αφού πέρασαν περισσότερα από 100 χρόνια μετά την αρχική αναγνώριση της κλινικής ύπαρξης της, η ΗΗΤ πλέον είναι αναγνωρισμένη ως μια ασθένεια με γενετικό υπόβαθρο και οφείλεται σε μεταλλάξεις σε γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στην μεσολάβηση των επιδράσεων των TGF-β (Transforming Growth Factors-β, TGF-β) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα γονίδια-στόχοι εκφράζονται κυρίως στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και καθορίζουν μία συγκεκριμένη οδό μεταβίβασης σήματος στο ενδοθήλιο[64].

### 1.2.1) Υπεροικογένεια TGF-β

Η υπεροικογένεια TGF-β αποτελείται από 33 μέλη, τα περισσότερα από τα οποία κωδικοποιούν διμερή εκκρινόμενα πολυπεπτίδια, τα οποία ελέγχουν αναπτυξιακές διαδικασίες όπως η γαστριδιοποίηση, ο άξονας συμμετρίας του σώματος, η μορφογένεση ειδικών οργάνων, η διαφοροποίηση ιστών, η μεσεγχυματική ρύθμιση και οι λειτουργίες των ανοσοποιητικών κυττάρων[65,66]. Σε κυτταρικό επίπεδο ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση, προσκόλληση, μετανάστευση και απόπτωση πολλών διαφορετικών κυτταρικών τύπων[67]. Τα μέλη της οικογένειας περιλαμβάνουν TGF-β, μορφογενετικές πρωτεΐνες οστών (bone morphogenetic proteins, BMPs), ακτιβίνες, ινχιπίνες και μυστατίνη[66]. Δύο μέλη της υπεροικογένειας TGF-β, οι TGF-β και οι BMPs, συμμετέχουν στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος και εμπλέκονται σε αγγειακές δυσλειτουργίες όπως η αθηροσκλήρωση, η πνευμονική υπέρταση και η ΗΗΤ[64]. Συγκεκριμένα οι ισομορφές TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 και οι BMP-2, BMP-4, BMP-6 και BMP-7 εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τοιχωμάτων των αγγείων και μπορούν να τροποποιούν την αγγειακή ανάπτυξη, καθώς ασκούν πολλαπλές επιδράσεις σε αυτά τα κύτταρα[66].

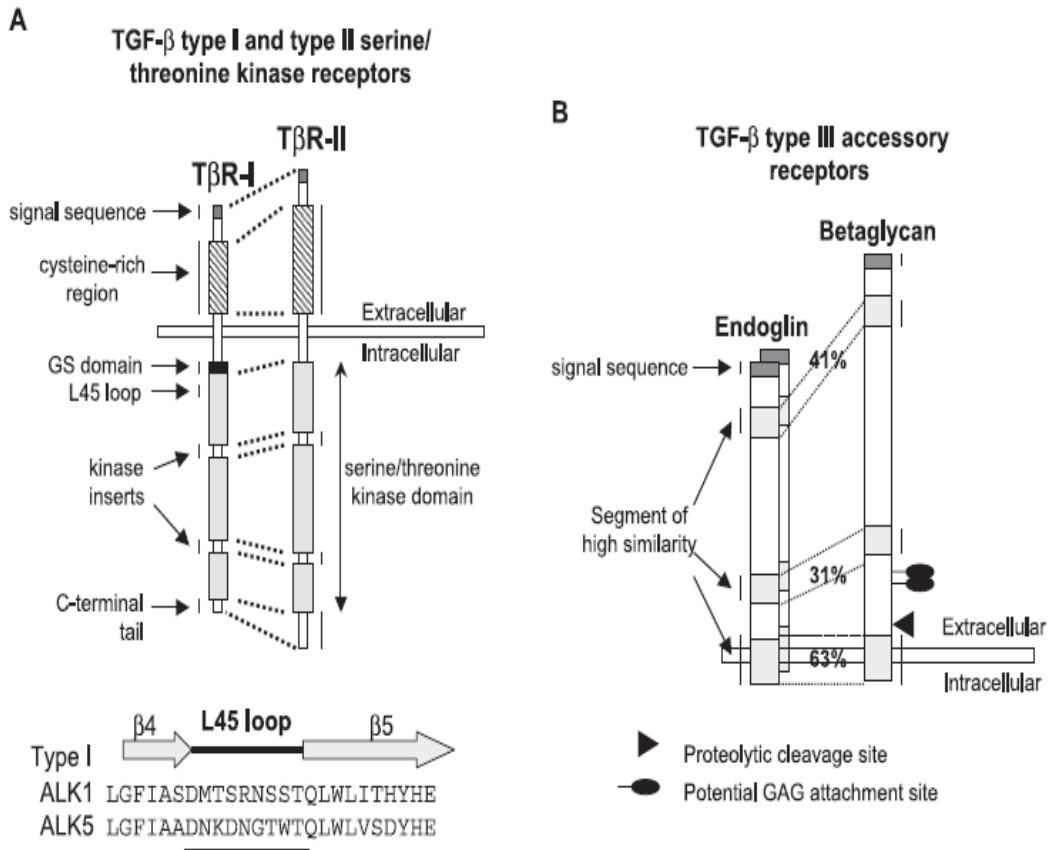
Οι TGF-β συντίθενται ως πρόδρομες πρωτεΐνες με ένα μεγαλύτερο αμινο-τελικό προ-πεπτίδιο ακολουθούμενο από ένα μικρότερο ώριμο διμερές καρβόξυ-τελικό πολυπεπτίδιο[65,68]. Το προ-πεπτίδιο (latency-associated peptide, LAP), παραμένει συνδεδεμένο (μη ομοιοπολικά) με το ώριμο πεπτίδιο μέσα στον πυρήνα του κυττάρου, και συνεισφέρει στην εξωκύτωση του συμπλόκου. Επίσης μεσολαβεί στην εναπόθεση του TGF-β στην εξωκυττάρια ουσία μέσω της ομοιοπολικής



σύνδεσης με μεγάλες εκκρινόμενες πρωτεΐνες, καλούμενες latent TGF- $\beta$  binding proteins (LTBPs), και με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η φιβρονεκτίνη και η φιβριλίνη-1[67,69]. Η ενεργοποίηση των ώριμων καρβοξυ-τελικών διμερών προσδετών βασίζεται σε διάφορες πρωτεάσες (όπως η ελαστάση, που διαχωρίζει την φιβριλίνη-1, η οικογένεια πρωτεασών BMP1/Tolloid, που διαχωρίζουν τα LTBPs και μεταλλοπρωτεάσες όπως η MMP2, που διαχωρίζει τα TGF- $\beta$  LAPs)[65].

### **1.2.2) Υποδοχείς TGF- $\beta$**

Όλοι οι TGF- $\beta$  προσδέτες μεταφέρουν τη βιολογική τους πληροφορία στα κύτταρα μέσω σύνδεσης στους υποδοχείς τύπου I και II, κατόπιν σχηματισμού ετεροτετραμερών συμπλόκων προσδέτου-υποδοχέα.[67]. Στους ανθρώπους και τα άλλα θηλαστικά υπάρχουν 7 υποδοχείς τύπου I και 5 υποδοχείς τύπου II. Οι υποδοχείς τύπου I, γνωστοί και ως *activin receptor-like kinase (ALKs)*, περιλαμβάνουν τους *ACVRL1*, *ACVR1*, *BMPRIA*, *ACVR1B*, *TGFBR1*, *BMPR1B*, *ACVR1C (ALK1-7)*, ενώ οι υποδοχείς τύπου II περιλαμβάνουν τους *TGFBR2*, *BMPR2*, *ACVR2*, *ACVR2B*, *AMHR2*[68]. Οι υποδοχείς τύπου I και II είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς και αποτελούνται 1.από μικρο εξωκυττάριο τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνη, 2.από μια απλή διαμεμβρανική περιοχή και 3.το ενδοκυττάριο τμήμα που περιλαμβάνει τις περιοχές κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Εικόνα 7) [70]. Το ενδοκυττάριο τμήμα περιλαμβάνει μια περιοχή κινάσης, που περιέχει κατάλοιπα με ισχυρή δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης από τη μία, και από την άλλη κατάλοιπα με μικρή δράση κινάσης τυροσίνης, γεγονός, που τους κατατάσσει ως κινάσες διπλής ειδικότητας[67]. Οι TGF- $\beta$  προσδέτες αλληλεπιδρούν επίσης με συν-υποδοχείς, οι οποίοι είτε διευκολύνουν είτε περιορίζουν την σηματοδότηση του υποδοχέα κινάσης. Στα θηλαστικά τέτοιοι συν-υποδοχείς είναι οι υποδοχείς τύπου III, όπως η ενδογλίνη και η πρωτεογλυκάνη (TGF- $\beta$ R3, T $\beta$ RIII), οι οποίοι ρυθμίζουν την σηματοδότηση TGF- $\beta$  [67].



**Εικόνα 7:** Όπως δείχνει το πρώτο μέρος της εικόνας 7, οι εξωκυττάριας περιοχές των TBR-I και TBR-II είναι πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης. Η ουρά του καρβόξυ-τελικού άκρου είναι μικρότερη στον TBR-I συγκριτικά με τον TBR-II. Η περιοχή πλούσια σε γλυκίνη/σερίνη (GS domain), η οποία ρυθμίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα, και ο βρόχος L4, μια εκτεθειμένη αλληλουχία 9 αμινοξέων ανάμεσα στις υποπεριοχές κινάσης IV και V, εντοπίζονται μόνο στον TBR-I. Η ενδογλίνη και η βηταγλυκάνη (TBR-III), όπως φαίνεται στο δεύτερο κομμάτι της εικόνας 7, είναι και αυτές απλοί διαμεμβρανικοί βοηθητικοί υποδοχείς που στερούνται κάποιου ενζυμικού μοτίβου στις μικρές τους ενδοκυτταρικές περιοχές. Οι κυτταροπλασματικές τους ουρές περιέχουν πολλά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης και μια θεωρούμενη περιοχή PDZ στα 3 τελευταία καρβόξυ-τελικά κατάλοιπα. Οι ενδοκυτταρικές περιοχές κινάσης των TBR-I διαμοιράζονται σημαντική ομολογία μεταξύ τους αλλά και με τους TBR-II. Οι TBR-II έχουν μικρή ομολογία μεταξύ τους στην εξωκυτταρική τους περιοχή αλλά σημαντική ομολογία στην ενδοκυτταρική περιοχή (Από *Lebrin et al, 2005*).

### 1.2.3) Σηματοδότηση TGF-β

Τα μέλη της υπερικογένειας TGF-β ασκούν τις δράσεις τους μέσω των υποδοχέων τύπου I και II (TβRI, TβRII). Οι TGF-β έχουν μεγάλη συγγένεια για τον υποδοχέα TβRII. Μετά την σύνδεση του TGF στον TβRII επιστρατεύεται ένας συγκεκριμένος TβRI και δημιουργείται ένα ετεροτετραμερές σύμπλοκο TβRII-TβRI. Σε μερικές περιπτώσεις, η συγγένεια του προσδέτη με τον υποδοχέα είναι χαμηλή και χρειάζεται ένας συνυποδοχέας για να ενισχυθεί η συγγένεια, όπως η βηταγλυκάνη και η ενδογλίνη. Με την δημιουργία του συμπλόκου TGF-TβRII/TβRI, ο TβRI τρανσφοσφορυλιώνεται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης από τον TβRII. Αυτό έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση του TβRI, ο οποίος διαδοχικά μεταδίδει το σήμα στον πυρήνα μέσω ενός καταρράκτη ενδοκυττάρων μεσολαβητών[71]. Αυτοί οι μεσολαβητές ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών Smad. Οι Smads αποτελούνται από 3 περιοχές[67]:

1. μία άμινο-τελική περιοχή Mad-homology 1 (MH1), που μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες και φέρει σήματα εντοπισμού πυρήνα (nuclear localization signals, NLSs) και μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA,
2. μια μέση περιοχή συνδέτη, που είναι πλούσια σε προλίνες και φωσφορυλιούμενες σερίνες-θρεονίνες και αλληλεπιδρά με προλυλλισομεράσες και λιγάσες οθμπικουιτίνης, και
3. μια καρβόξυ-τελική MH2 περιοχή, που συνδέεται στους υποδοχείς τύπου I και αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες και αυτή μεσολαβεί στον ομο- και πολύ-ολιγομερισμό των Smad και στην δυναμική τρανσενεργοποίηση των πυρηνικών συμπλόκων Smad.

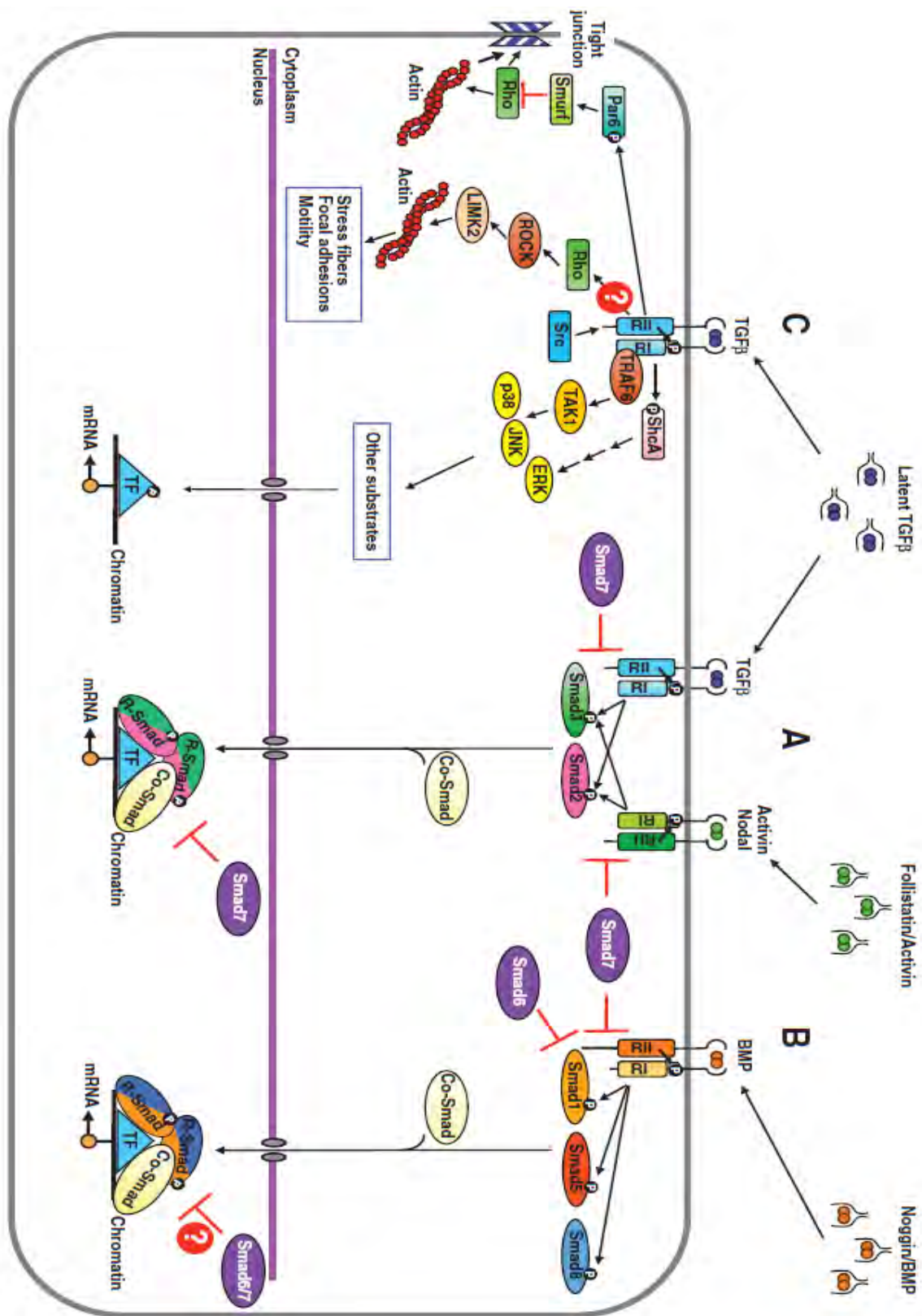
Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι των Smad πρωτεϊνών[73]:

- ❖ Οι Smad, που ρυθμίζονται από τους υποδοχείς (receptor regulated Smads, R-Smads), που περιλαμβάνουν τις Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 και Smad8,
- ❖ Οι κοινοί μεσολαβητές Smad (common mediator Smads, co-Smads), που περιλαμβάνουν τη SMAD4 και
- ❖ Οι ανασταλτικές Smad (inhibitory Smads, I-Smads), που περιλαμβάνουν τις Smad6 και Smad7.

Οι R-Smads χωρίζονται περαιτέρω σε δύο κατηγορίες, τις BMP-Smads (Smad1, 5, 8) και τις TGF-β/activin Smads (Smad2, 3)[74]. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα, οι R-Smads φωσφορυλιώνονται από τον TβRI στα ακραία κατάλοιπα σερίνης του καρβόξυ-τελικού άκρου[74]. Αυτό επιτρέπει στις R-Smads να επικοινωνούν με τον Co-Smad και να σχηματίζουν ετερομερή σύμπλοκα. Το ολιγομερές Smad, που προκύπτει θεωρείται πως αποτελείται από ένα τριμερές δύο R-Smad και ένα μόνο Co-Smad, όπως για παράδειγμα ένα σύμπλοκο SMAD2-SMAD2-SMAD4, ένα σύμπλοκο SMAD3-SMAD3-SMAD4 ή ένα σύμπλοκο SMAD2-SMAD3-SMAD4. Αυτά τα σύμπλοκα στη συνέχεια μετατοπίζονται στον πυρήνα και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Η συγγένεια των Smad με το DNA είναι αρκετά ασθενής και γι αυτό απαιτείται ο σχηματισμός συμπλόκου με μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 8) [72,75].

Ειδικά σύμπλοκα TGF-β-Smad ή BMP-Smad προάγουν την έκφραση των ανασταλτικών I-Smads, Smad6 και Smad7, οι οποίες ρυθμίζουν αρνητικά την αχική ενεργοποίηση της οδού των SMADs [76]. Οι Smad6 και Smad7 συνδέονται στους υποδοχείς τύπου I και αναστέλλουν ανταγωνιστικά τη φωσφορυλίωση των R-Smad. Επί πλέον επιστρατεύουν φωσφατάσες και Smurf λιγάσες, που μειώνουν τα επίπεδα του υποδοχέα και την λειτουργία του[76]. Η Smad7 αναστέλλει και το TGF και το BMP μονοπάτι μέσω ειδικών καταλοίπων λυσίνης στην MH2 περιοχή του, ενώ η Smad6 δείχνει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τους BMP υποδοχείς τύπου I[77,78]. Δυο ρυθμιστικοί μηχανισμοί, που μεσολαβούν στην SMAD7-εξαρτώμενη ουβικιτιλίωση και απορύθμιση του υποδοχέα TGF-β ανακαλύφθηκαν πρόσφατα.:

1. Η συνοδός πρωτεΐνη HSP90 συνδέεται στον TβRII και στον TβRI και τους προστατεύει από την ουβικιτιλίωση από την SMURF2 συνεισφέροντας θετικά στην TGF-β σηματοδότηση και
2. Η SIK (salt-inducible kinase, μια κινάση που ρυθμίζεται από το AMP) επάγεται από την οδό ενεργοποίησης SMAD μετά την σηματοδότηση από τους TGF-β. Η SIK συνδέεται με την SMAD7 και με τον TβRI για να προάγει την απορύθμιση του υποδοχέα[67,79,80].



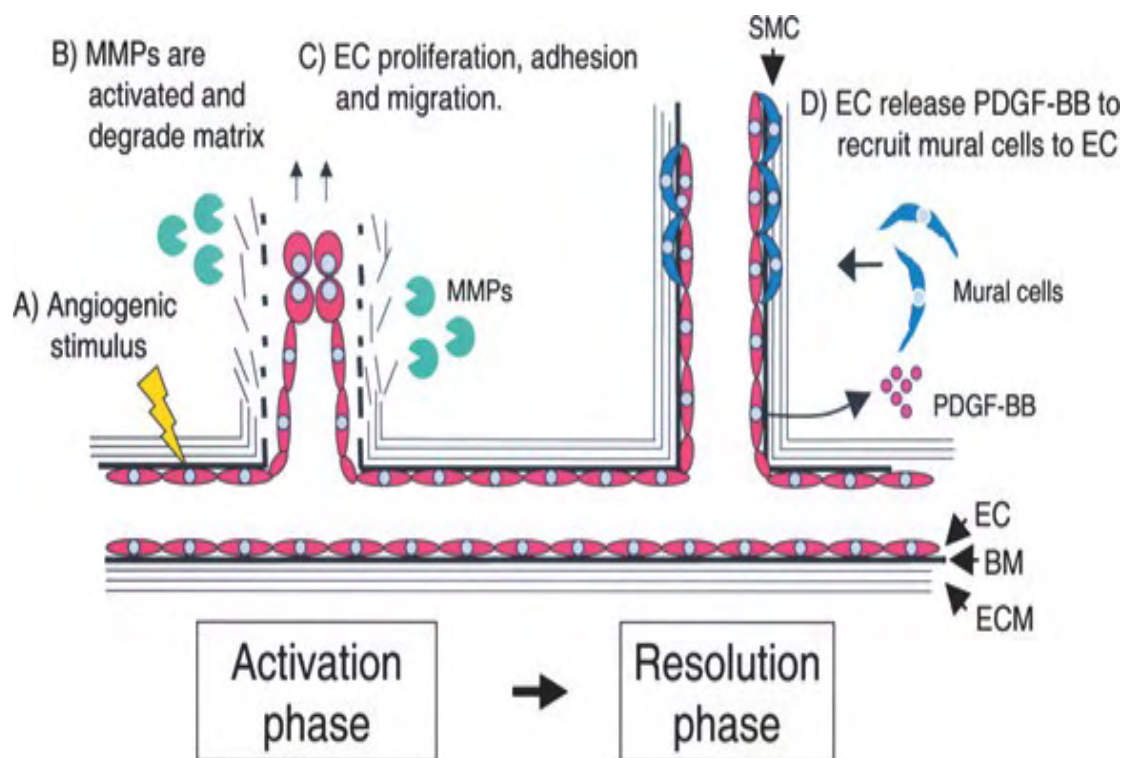
Εικόνα 8: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των TGF-β (A) και BMP (B) όπως αυτά συμβαίνουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Από Moustakas et al 2009).

#### **1.2.4) Σηματοδότηση TGF-β και αγγειογένεση**

Το καρδιαγγειακό σύστημα είναι το πρώτο λειτουργικό σύστημα οργάνων, που δημιουργείται κατά την εμβρυογένεση. Η ανάπτυξη του αρχίζει με την εμφάνιση διακριτών νησίδων αίματος στον λεκιθικό σάκο. Εξωεμβρυονικά μεσοδερμικά κύτταρα παραγόμενα από το επίβλαστο θα διαφοροποιηθούν σε αιμαγγειοβλάστες, τα οποία είναι διδυναμικά βλαστικά κύτταρα, ικανά να διαφοροποιούνται σε αιματοποιητικά και ενδοθηλιακά κύτταρα[81]. Οι αιμαγγειοβλάστες σχηματίζουν ένα αρχέγονο δίκτυο σε μια διαδικασία γνωστή ως αγγειογένεση. Το ανερχόμενο αγγειακό δίκτυο υπόκειται σε γρήγορη αναδιαμόρφωση για να σχηματίσει ένα ώριμο δίκτυο, σαν δέντρο, με μεγαλύτερα αγγεία, που τροφοδοτούν τα μικρότερα τριχοειδή. Η αγγειογένεση, ως διαδικασία, περιλαμβάνει την διαφορική ανάπτυξη και εξάπλωση των ενδοθηλιακών σωλήνων και την επιστράτευση και διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και περικύτταρα. Η αγγειογένεση απαιτεί εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα και την εξωκυττάρια ουσία, τα περικύτταρα ή τα λεία μυϊκά κύτταρα[81].

Η αγγειογένεση μπορεί να διακριθεί σε δύο χωριστές αλλά ισορροπημένες φάσεις (Εικόνα 9)[70]. Μια φάση ενεργοποίησης, που περιλαμβάνει αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, εκφυλισμό της βασικής μεμβράνης, πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και μια φάση διαχωρισμού, που περιλαμβάνει αναστολή του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, επαναφορά της βασικής μεμβράνης και σταθεροποίηση των αγγείων μέσω της επιστράτευσης και διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων σε περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα[70].

Η επιστράτευση των μεσεγχυματικών κυττάρων στα νέα αγγεία μεσολαβείται από παράγοντες, όπως ο PDGF-BB και ο TGF-β. Μόλις έρθουν σε επαφή τα μεσεγχυματικά κύτταρα με τα ενδοθηλιακά, ο λανθάνων TGF-β ενεργοποιείται και έτσι προάγει την διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα. Τα περικύτταρα συνεισφέρουν εν μέρει στην επιβίωση και την σταθερότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της έκφρασης του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF).



Εικόνα 9: Η διαδικασία της αγγειογένεσης. Στην εικόνα δείχνεται η σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας των νέων αιμοφόρων αγγείων στον άνθρωπο. Η διαδικασία περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια, την φάση ενεργοποίησης και τη φάση διαχωρισμού. Τα βήματα της όλης διαδικασίας της αγγειογένεσης έχει ως εξής: (A) Η αγγειογένεση αρχίζει με κάποιο ερέθισμα και αγγειογενετικοί παράγοντες προσδένονται στους υποδοχείς τους ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια. (B) Ενεργοποιούνται οι μεταλλοπρωτεάσες και αποσυνθέτουν την κυτταρική βασική μεμβράνη. (C) τα κύτταρα διαιρούνται και μεταναστεύουν έξω από το τοίχωμα του τριχοειδούς αγγείου. (D) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν PDGF-BB που είναι χημειοτακτικό για τα περικύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα (SMCs). Τα SMCs θα καλύψουν τον κενό ενδοθηλιακό σωλήνα αναστέλλοντας την διαίρεση και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγοντας την διαφοροποίηση, την ηρεμία και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. (Από *Goumans et al, 2003*)

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα λοιπόν ο TGF-β έχει διπλή δράση: και προάγει και αναστέλλει την διαίρεση τους. Αυτή η διπλή δράση οφείλεται στην ύπαρξη δύο υποδοχέων τύπου I και είναι δοσο-εξαρτώμενη. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ο TGF-β διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις αναστέλλει αυτές τις δράσεις[82].

### **1.2.5) Γενετική ετερογένεια στην HHT**

Η HHT είναι ένα γενετικά ετερογενές σύνδρομο και μέχρι σήμερα μεταλλάξεις σε τουλάχιστον 5 γονίδια ευθύνονται για την ανάπτυξη HHT[81]. Ο πρώτος γενετικός τύπος, που αναγνωρίστηκε ως υπεύθυνος σε HHT ασθενείς, χαρτογραφήθηκε, έπειτα από ανάλυση γενετικής σύνδεσης, στο χρωμόσωμα 9 στην περιοχή q33-34[84-86] και το γονίδιο, που βρέθηκε ήταν η ενδογλίνη (*ENG*)(GenBank.....)[87], οι μεταλλάξεις της οποίας προκαλούν την HHT τύπου I (HHT1)[82]. Παρόλα αυτά, έρευνες έδειξαν πως υπάρχουν οικογένειες, που πάσχουν από HHT, και οι οποίες δεν συνδέονται με τον γενετικό τόπο του χρωμοσώματος 9[85]. Μελέτες με ανάλυση γενετικής σύνδεσης αυτών των οικογενειών ανέδειξαν ένα δεύτερο γενετικό τόπο στο χρωμόσωμα 12, στην περιοχή 12q11-12q14, και το υπεύθυνο γονίδιο βρέθηκε πως είναι το activin receptor-like kinase 1 (*ALK1/ACVRL1*), οι μεταλλάξεις του οποίου προκαλούν την HHT τύπου 2 (HHT2)[84,88]. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί περιστατικά με χαρακτηριστικές κλινικές εκδηλώσεις της HHT, τα οποία όμως δεν είχαν μεταλλάξεις στην *ENG* ή στον *ALK1*[89]. Πρόσφατα χαρτογραφήθηκαν δύο νέοι τόποι για την HHT στα χρωμοσώματα 5 (HHT3)[90] και 7 (HHT4)[91] χωρίς να αναγνωριστούν ακόμα τα υπεύθυνα γονίδια ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο *MADH4*, που παράγει την *SMAD4*, προκαλεί το συνδυαστικό σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης και HHT (JPHT)[92]. Ο πίνακας 3, παρακάτω, συνοψίζει τα γονίδια που προκαλούν τις διάφορες μορφές HHT.



<i>HHT</i>	<i>OMIM</i>	<i>HHT type</i>	<i>Chromosome</i>	<i>Gene symbol</i>	<i>Protein</i>	<i>Sequence accession IDs</i>	<i>Earlier symbol</i>	<i>Aliases</i>
<b>HHT1</b>	#187300	Type 1	9	<i>ENG</i>	Endoglin	AF035753	ORW1,ORW	HHT1, END, CD105
<b>HHT2</b>	#600376	Type 2	12	<i>ACVRL1</i>	ALK-1	L17075	ACVRLK1, ORW2	HHT2, <i>ALK1</i>
<b>JPHT</b>	#175050	JPHT	18	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD4</i>	NM005359	MADH4	DPC4
<b>HHT3</b>	#601101	Type 3	5					
<b>HHT4</b>	#610655	Type 4	7					
<b>HHT5</b>	#615506	Type 5	10	<i>GDF2</i>	<i>BMP9</i>	AC021038		

**Πίνακας 3:** Η γενετική ετερογένεια στην HHT. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι τύποι της HHT και τα γονίδια ή οι γενετικοί τόποι που είναι υπεύθυνοι για την κλινική εκδήλωση της HHT

Περίπου το 85% των περιστατικών έχουν HHT τύπου 1 ή τύπου 2 καθώς οι μεταλλάξεις εντοπίζονται είτε στο γονίδιο *ENG* είτε στο *ACVRL1*. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *SMAD4* εντοπίζονται στο 2% ενώ έχει βρεθεί και μια μετάλλαξη στο γονίδιο *BMPR2*[83,93].

Στην HHT, οι μεταλλάξεις τόσο στο γονίδιο της ενδογλίνης όσο και στο γονίδιο του *ALK1* οδηγούν σε μια δυσλειτουργία του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β στα ενδοθηλιακά κύτταρα αφού και τα δύο γονίδια εκφράζονται κυρίως στο ενδοθήλιο, προκαλώντας έτσι τις μορφολογικές ανωμαλίες των αγγείων[94]. Ο TGF-β και οι υποδοχείς του εμπλέκονται στην αγγειογένεση και την αγγειακή ανάπτυξη κατά την εμβρυική περίοδο και στην αγγειακή ανακατασκευή στους ενήλικες[95,96].

### **1.2.6) Η γενετική ετερογένεια σχετίζεται με τον κλινικό φαινότυπο**

Όλα τα κλασικά χαρακτηριστικά της HHT είναι ορατά τόσο στην HHT1 όσο και στην HHT2 αλλά η εξάπλωση συγκεκριμένων αγγειακών ανωμαλιών διαφέρει ανάλογα με το γενότυπο. Τα PAVMs είναι πιο κοινά στην HHT1 από ότι στην HHT2[97-102]. Οι ασθενείς με HHT1 προσβάλλονται περισσότερο από CAVMs από ότι ασθενείς με HHT2[98-101] Οι ασθενείς με HHT2 έχουν μεγαλύτερη εξάπλωση σε ηπατικά AVMs και οξύτητας της ασθένειας εξαιτίας αυτών[99-102]. Επίσης πιθανολογείται πως στους ασθενείς με HHT2 αναπτύσσουν περισσότερα παγκρεατικά

AVMs και δερματικές τηλαγγειεκτασίες νωρίτερα από ασθενείς με HHT1[103,104]. Δεν υπάρχουν ενδείξεις, όμως, που να προτείνουν, πως συγκεκριμένες μεταλλάξεις ενός γονιδίου υπευθύνου για την HHT αποδίδουν διαφορετικούς HHT φαινοτύπους.

#### 1.2.6.1) Ενδογλίνη και HHT1

Οι πρώτες μελέτες σύνδεσης χαρτογράφησαν την αιμορραγική τηλαγγειεκτασία τύπου 1 (HHT1, OMIM: #187300) στο χρωμόσωμα 9q33-34, όπου τον ίδιο χρόνο είχε χαρτογραφηθεί η ενδογλίνη (*ENG*, OMIM: #131195). Η χρωμοσωμική θέση του γονιδίου της ενδογλίνης και το μοτίβο έκφρασης και λειτουργίας της οδήγησαν στην επιβεβαίωση ως γονίδιο σχετιζόμενο με ασθένεια[85].

Το cDNA που κωδικοποιεί την ενδογλίνη, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που λειτουργεί ως βοηθητικός υποδοχέας στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGF- $\beta$ , απομονώθηκε το 1990[86]. Η πρωτεΐνη εκφράζεται στα αγγειακά ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση των αγγειακών τοιχωμάτων καθώς προάγει την κυτταρική διαίρεση μέσα από το μονοπάτι TGF- $\beta$ /*ALK1*[105,106]. Η πρωτεΐνη εκφράζεται ως ομοιοπολικά μέσω δισουλφιδικών δεσμών συνδεδεμένο ομοδιμερές μοριακού βάρους 180 kDa, αποτελούμενη από δύο υπομονάδες των 90 kDa. Τα 17 κατάλοιπα κυστεΐνης και οι παραγόμενοι δεσμοί μέσα στις αλυσίδες αλλά και μεταξύ των αλυσίδων προτείνουν πως η αναδίπλωση ρυθμίζεται ερμητικά. Αυτό βασίζεται στα ευρήματα πως οι περισσότερες μεταλλάξεις στο γονίδιο *ENG* οδηγούν σε δομική αστάθεια και χάσιμο της πρωτεϊνικής λειτουργίας[64]. Εξωκυτταρικά αποτελείται από 561 αμινοξέα, με μια μικρή υδροφοβική έκταση 17 αμινοξέων που διαχωρίζουν τις περιοχές πλούσιες σε N-συνδεδεμένες στα κατάλοιπα 63, 96, 109 και 282 από το άμινο-τελικό άκρο, και O-συνδεδεμένες στα κατάλοιπα από 311 έως 551 θέσεις γλυκοσυλίσωσης. Έπειτα ακολουθεί μια υδροφοβική περιοχή 25 αμινοξέων που εκτείνεται στην πλασματική μεμβράνη και η κυταροπλασματική ουρά που αποτελείται από 47 αμινοξέα πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη και είναι υψηλά φωσφορυλιωμένη σε κατάλοιπα σερίνης[107,108].

Μέχρι σήμερα μεταλλάξεις βρέθηκαν στα εξόνια 1 ως 12 τα οποία κωδικοποιούν την εξωκυττάρια περιοχή και οι μεταλλάξεις είναι όλων των ειδών: διαγραφές, δυσσυνθετικές, θέσεων ματίσματος, ενθέσεις, μη νοηματικές και indels. Ο ολικός αριθμός μεταλλάξεων ανά εξόνιο είναι παρόμοιος εκτός από τα μικρά εξόνια 1, 9b

και 12 και καμία στο εξόνιο 13[64]. Όμως, η ανάλυση έκφρασης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών ενδογλίνης είναι σπάνια ανιχνεύσιμες και μόνο αν εκφράζονται ως παροδικά είδη, που δεν φτάνουν στην επιφάνεια του κυττάρου. Έχει αποδειχτεί πως οι περισσότερες μεταλλάξεις που οδηγούν σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και περικοπή πιθανόν συμβάλλουν στην μη νοηματική μεσολαβούμενη αλλοίωση και γι' αυτό και κατά συνέπεια σε μειωμένα επίπεδα mRNA και πολύ ασταθείς μεταλλαγμένες πρωτεΐνες[109-111]. Διάφορες υποκαταστάσεις απλών βάσεων στο *ENG* που αλλάζουν ένα αμινοξύ και περιγραφόταν ως μεταλλάξεις που προκαλούν HHT πλέον αναγνωρίζονται ως πολυμορφισμοί.

#### 1.2.6.2) HHT3, HHT4 και HHT5

Μελέτες σύνδεσης σε μια οικογένεια με HHT υπέδειξαν πως η γενεαλογία αυτή δεν συνδεόταν με τα γονίδια *ENG* και *ALK1* αφήνοντας ανοιχτή την υπόθεση ενός τρίτου γονιδίου που σχετίζεται με την HHT[89,112]. Το γονίδιο αυτό χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 5 στην περιοχή 5q31.3-5q32[90]. Αυτή η περιοχή είναι 5,7 Mb μακριά, ανάμεσα στους μικροδορυφορικούς δείκτες *D5S2011* και *D5S2490*. Αυτή η περιοχή περιλαμβάνει 38 γονίδια σύμφωνα με τη βάση γενετικών δεδομένων Ensembl, τα οποία χωρίζονται σε δύο κατηγορίες υποψηφίων γονιδίων. Η πρώτη κωδικοποιεί πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αγγειογένεση όπως τα *PCDH12*, *SPRY4* και *FGF1* και η δεύτερη κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σηματοδότηση μέσω κινασών σερίνης/θρεονίνης όπως η *PPP2R2B* και η *STK32A*. Έως τώρα οι πρωτεΐνες VE-Cadherin-2 και Sprouty4 που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *PCDH12* και *SPRY4* αντίστοιχα έχουν αποκλειστεί από τη συσχέτιση με την HHT3[113].

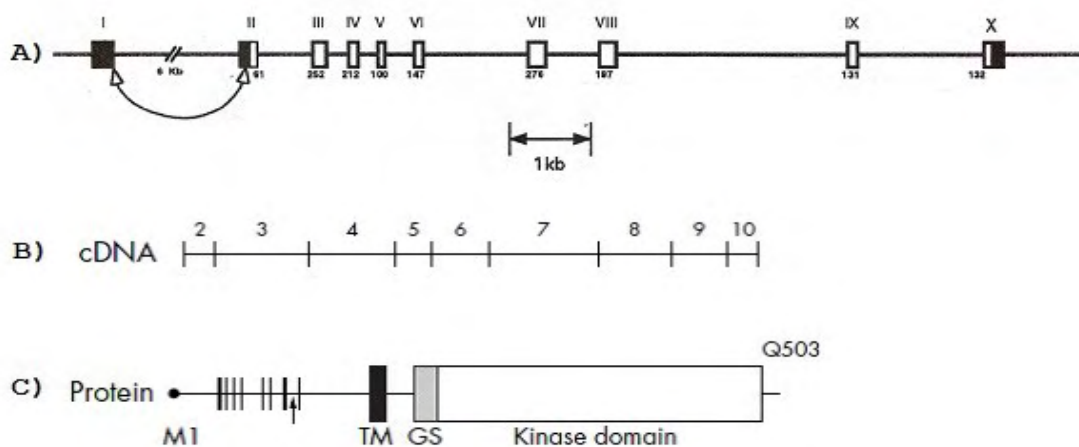
Επιπλέον, ακόμα μία μελέτη ανάλυσης σύνδεσης υποδεικνύει πως υπάρχει και τέταρτο υποψήφιο γονίδιο για την αιμορραγική τελαγγειεκτασία (HHT4). Αυτή η μελέτη δείχνει πως το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 στην περιοχή p14 ανάμεσα στους δείκτες *D7S2252* και *D7S510* σε μία έκταση 7Mb. Σε αυτήν την περιοχή υπάρχουν 47 γνωστά και 23 υποτιθέμενα γονίδια[91].

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε και ένα πέμπτο γονίδιο το οποίο ευθύνεται για την εμφάνιση της HHT (HHT5). Το γονίδιο, του οποίου οι μεταλλάξεις συσχετίστηκαν με την HHT, είναι το Growth/Differentiation Factor 2 (*GDF2*) (OMIM: #605120), ή αλλιώς γνωστό ως BMP9[114].

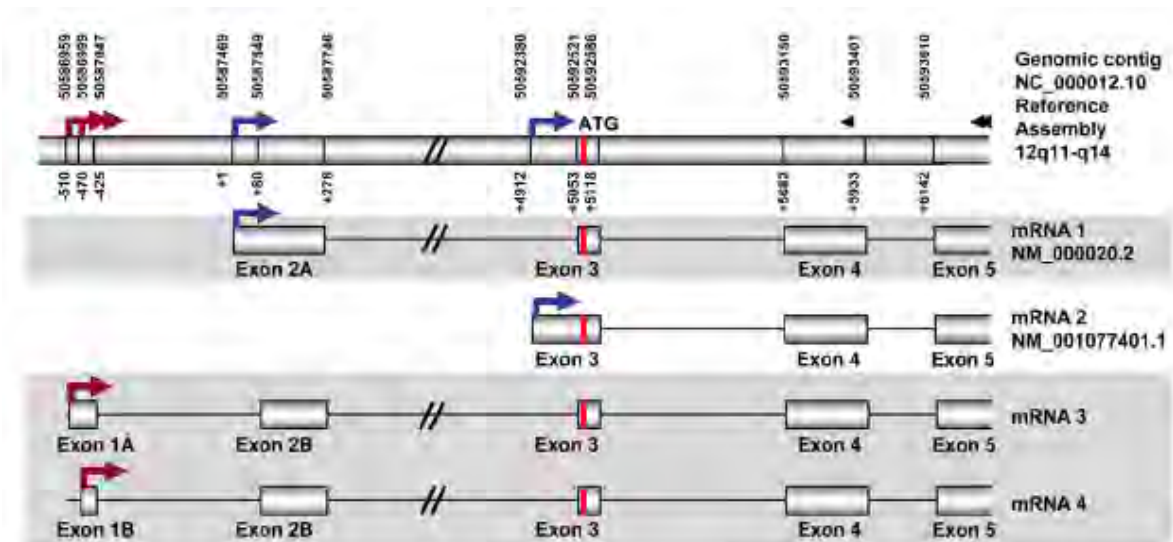
### 1.3) *ALK1* και *HHT2*

Ο δεύτερος γενετικός τόπος για την *HHT* εντοπίστηκε το 1995, έπειτα από μελέτες γενετικής σύνδεσης, στην περικεντρομερική περιοχή του χρωμοσώματος 12[114]. Επιπλέον μελέτες έδειξαν, ότι το γονίδιο βρίσκεται ανάμεσα στους μικροδορυφορικούς δείκτες *DI2S347* και *DI2S368* στην περιοχή 12q11-q14 καταλαμβάνοντας μια έκταση 15.943 bp[88]. Το υπεύθυνο γονίδιο είναι το Activin-A receptor type II-like kinase 1 (*ACVRL1*, GeneID: 94; Ensembl:ENSG00000139567; HPRD:03181; MIM:601284) [115].

Η δομή του γονιδίου, η οποία φαίνεται στην εικόνα 10, περιγράφηκε το 1993, παράλληλα, από τους *Attisano et al* και *ten Dijke et al*[116,117]. Η 5' αμετάφραστη αλληλουχία του *ACVRL1* διαφέρει σε αυτές τις δύο δημοσιεύσεις. Η γενωμική αλληλούχιση, όπως δημοσιεύθηκε από τους *Attisano et al* δείχνει, ότι μέρος του εξονίου 2 αποτελεί την 5' αμετάφραστη περιοχή. Κατά τους *ten Dijke et al*, η 5' αμεταφραστη περιοχή περιλαμβάνει το εξόνιο 1 και μέρος του εξονίου 2 λόγω μιας αλλαγής στην συρραφή (μάτισμα) των εξονίων. Η κωδική περιοχή εμπεριέχεται σε 9 εξόνια, με το κωδικόνιο έναρξης να εντοπίζεται στο εξόνιο 2 και το κωδικόνιο λήξης στο εξόνιο 10. Όλα τα ιντρόνια ακολουθούν τον GT-AC κανόνα εκτός από το ιντρόνιο 6, το οποίο έχει μια μη συναινετική (non-consensus) αλληλουχία στην 5' θέση, όπου υπάρχει η θέση ματίσματος TAGgcaag. Έως πρότινος είχαν περιγραφεί αυτά τα δύο διαφορετικά μετάγραφα mRNA: το μετάγραφο 1 (Genbank: NM\_000020.2) και το μετάγραφο 2 (Genbank: NM\_001077401.1) (Εικόνα 11). [118].



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου *ACVRL1*. A) Η δομή του γονιδίου όπως υπάρχει πάνω στην αλυσίδα του DNA. Αποτελείται από 10 εξόνια, εκ των οποίων το πρώτο μεταγράφεται μεν, αλλά εν συνεχεία αποκόπτεται και δεν αποτελεί μέρος του cDNA (το βέλος δείχνει τη συρραφή με την οποία το εξόνιο 1 αποκόπτεται κατά την ωρίμανση του mRNA. B) Η δομή του cDNA όπως προκύπτει μετά την ολοκλήρωση της μεταγραφικής διαδικασίας. C) Η πρωτεϊνική δομή που προκύπτει μετά την ολοκλήρωση της μεταφραστικής διαδικασίας. TM= διαμεμβρανική περιοχή, GS= Kinase domain= περιοχή με δράση κινάσης (Από Berg et al, 1997 (A), Abdalla et al, 2006 (B and C)).



Εικόνα 11: Τα 4 μεταγράφα του γονιδίου *ACVRL1*, τα οποία έχουν βρεθεί έως σήμερα στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στη συγκεκριμένη μελέτη, οι ερευνητές έχουν επαναριθμήσει τις περιοχές των εξονίων με βάση τη διαφορετικότητα των μεταγράφων. Ως εκ τούτου, η αρίθμηση των εξονίων προτάθηκε να αλλάξει με το εξόνιο 2, από το οποίο αρχίζει η μετάφραση, μετατρέπεται σε εξόνιο 3, καθώς στα μεταγράφα 3 και 4 βρέθηκαν να υπάρχουν, ανοδικά του σημείου έναρξης μεταγραφής, 2 περιοχές, οι οποίες μεταγράφονται αλλά δε μεταφράζονται και ως αποτέλεσμα τα εξόνια από 10 γίνονται 12. Παρόλαυτα, επειδή το 1<sup>ο</sup> μεταγράφο εμφανίζεται κατά 90% στα κύτταρα, επίσημα έχει παραμείνει η αρχική αρίθμηση, ως αναφέρεται στην Εικόνα 10. Το βέλος υποδεικνύει την αρχή των μεταγράφων και η κόκκινη περιοχή το όριο από το οποίο αρχίζει η μετάφραση. Να σημειωθεί πως όλα τα μεταγράφα παράγουν την ίδια πρωτεΐνη. (Από Garrido-Martin EM et al, 2010).

Ο χαρακτηρισμός της 5' αμετάφραστης περιοχής και του υποκινητή του *ACVRL1* απεκάλυψε άλλα δύο μετάγραφα με θέση έναρξης μεταγραφής κεντρομερικά των προηγούμενων 2 δημοσιευμένων περιοχών (transcription start sites, TSS). Αυτά τα μετάγραφα περιέχουν ένα “ψευδές” εξόνιο, εγείροντας την υπόνοια, ότι στο *ACVRL1* μπορεί να υπάρχουν διάφορες θέσεις έναρξης μεταγραφής. Αυτό είναι βασικό χαρακτηριστικό γονιδίων, τα οποία στην 5' αμετάφραστη περιοχή δεν περιέχουν τις χαρακτηριστικές TATA αλληλουχίες, όπως είναι και το *ACVRL1* γονίδιο. Στα νέα μετάγραφα, στα οποία το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης δεν επηρεάζεται, το πρώτο εξόνιο δεν μεταφράζεται και γι' αυτό δεν υπάρχει καμία αλλαγή στην πρωτεϊνική αλληλουχία. Αυτή η παρατήρηση προσδίδει έμφαση στην σπουδαιότητα των μηχανισμών της μεταφραστικής και μεταμεταφραστικής ρύθμισης του *ACVRL1*. Η ύπαρξη διαφορετικών μεταγραφόμενων, αλλά μη μεταφραζόμενων περιοχών, υποδηλώνει ρύθμιση της έκφρασης του *ALK1*, που αφορά στο ρυθμό μεταγραφής, στη σταθερότητα του mRNA ή στην αλληλεπίδραση με άλλα RNAs ή άλλες πρωτεΐνες, που συνδέονται στο RNA. Επίσης, όλα τα μετάγραφα του *ACVRL1* του ανθρώπου αλλά και άλλων θηλαστικών φαίνεται να αρχίζουν με ένα μη μεταφραζόμενο εξόνιο. Οπότε το *ACVRL1* φέρεται να περιέχει σημαντικά μοτίβα για την μεταγραφική ρύθμιση στο πρώτο εξόνιο [118].

Η ανάλυση της βασικής δραστηριότητας του υποκινητή ανέδειξε την ύπαρξη ρυθμιστικών στοιχείων, από τη θέση -1035 έως το TSS και ειδικότερα στο κομμάτι -284 ως το TSS. Επίσης πιθανολογείται η ύπαρξη ενός καταστολέα σε ένα τμήμα ανάμεσα στις θέσεις -422 και -284 κεντρομερικά από το TSS. Η *in silico* μελέτη της αλληλουχίας του υποκινητή ανέδειξε διάφορα σημαντικά στοιχεία, τα οποία υπάρχουν και στο γονίδιο *ENG*, που μπορεί να είναι κρίσιμα για την συντονισμένη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων. Οπότε το *ACVRL1* μπορεί να ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι Hif-1a, Smad6, Ets και Sp1. Σημαντικό είναι, ότι στις θέσεις -808/-792, -286/-274 και -236/-219 βρέθηκαν αλληλουχίες-ρυθμιστικά στοιχεία, που αναποκρίνονται σε Hif-1a δομές. Η πιθανότητα απόκρισης του *ACVRL1* στον Hif-1a υποστηρίζεται από το γεγονός, ότι η υποξία προάγει την αγγειογένεση, η οποία είναι μια διαδικασία, που ρυθμίζεται από τον *ALK1*. Επίσης, υπάρχουν διάσπαρτα στοιχεία KLF, τα οποία είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των γονιδίων των υποδοχέων TGF-β, στα οποία η μεταγραφή επάγεται από τον KLF6 ως πρώιμη απόκριση σε τραυματισμό [106,118,119]. Από την άλλη η εύρεση στοιχείων

Εts πιθανολογεί ρύθμιση από τις MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases)[120]. Επιπλέον βρέθηκαν περιοχές AP1 και NFκB θέτοντας υποψίες, ότι το γονίδιο *ACVRL1* θα μπορούσε να εμπλεκείται στον μηχανισμό απόκρισης στην φλεγμονή.

Το πλέον αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό είναι η εύρεση πολλαπλών στοιχείων Sp1 δίπλα στα διαφορετικά TSSs. Το Sp1 έχει περιγραφεί ως ένας γενικός μεταγραφικός παράγοντας, που εμπλέκεται στους βασικούς μεταγραφικούς μηχανισμούς γονιδίων, των οποίων οι υποκινητές στερούνται των ειδικών περιοχών TATA και CAAT. Η εμπλοκή του Sp1 ενισχύεται από το γεγονός, ότι οι συναινετικές αλληλουχίες πρόσδεσης του Sp1 στον υποκινητή του *ACVRL1* είναι υψηλά διατηρημένες ανάμεσα σε διάφορα είδη. Αυτό σημαίνει, ότι η βιολογική συμπεριφορά του Sp1 στην μεταγραφή του *ACVRL1*[116] είναι καλά διατηρημένη. Ο Sp1 είναι απαραίτητος παράγοντας-κλειδί για την βασική μεταγραφή του *ACVRL1*. Ένας παράγοντα κλειδί, που ρυθμίζει την εξάρτηση της μεταγραφής από τον Sp1 είναι ο βαθμός μεθυλίωσης των νησίδων CpG, που περιέχονται στα συναινετικά στοιχεία Sp1. Σε μερικά γονίδια η μεθυλίωση της κυτοσίνης των περιοχών Sp1 αναφέρεται ως δείκτης της ειδικής έκφρασης στα όργανα και ως ένας ειδικός ρυθμιστής της έκφρασης[121]. Παρόμοια μπορεί να είναι και η περίπτωση του *ACVRL1*, στην οποία η απομεθυλίωση του DNA στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής του *ACVRL1*, ενδεχομένως λόγω της απομεθυλίωσης των νησίδων CpG των Sp1 περιοχών[118].

Ο *ALK1* είναι ένας μεμβρανικός κυτταρικός υποδοχέας τύπου I της υπεροικογένειας προσδετών TGF-β μεγέθους 503 αμινοξέων. Όπως και οι υπόλοιποι τύπου I υποδοχείς, ο *ALK1* αποτελείται από μια άμινο-τελικό εξωκυτταρική περιοχή με 10 διατηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική περιοχή που αποτελείται στην πλειονότητα της από δομικές μονάδες κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Ο *ALK1* μοιράζεται μια σχετικά υψηλή ομολογία στην περιοχή της κινάσης με τους άλλους ALK υποδοχείς[122]. Ο *ALK1*, όπως έχει ήδη αναφερθεί, εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, αλλά οι κύριοι ρόλοι του σχετίζονται με την έκφραση στο ενδοθήλιο. Η ειδική έκφραση του *ALK1* στο ενδοθήλιο μπορεί να εξηγηθεί από την παρουσία στην περιοχή του υποκινητή του *ACVRL1* των περιοχών ανταπόκρισης σε μεταγραφικούς παράγοντες, που προαναφέρθηκαν[118].



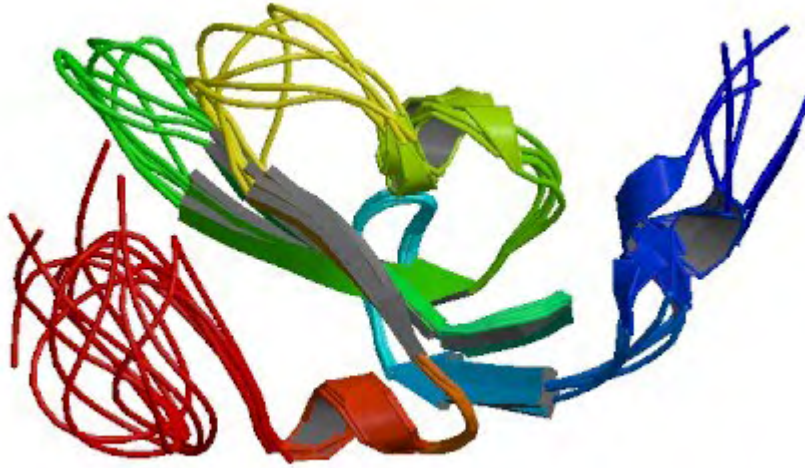
1 ATGACCTGGGGCTCCCCAGGAAAGGCCTTCTGATGCTGCTGATGGCCTTGGTGACCCAGGGAGACCCTGTGAAG  
76 CCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGGCCTGG  
151 TGCACAGTAGTGCTGGTGCGGGAGGAGGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGGCTGCGGGAACCTTGACAGGGAG  
226 CTCTGCAGGGGGCGCCCCACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCGACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCC  
301 CTGGTGCTGGAGGCCACCCAACCTCCTTCGGAGCAGCCGGGAACAGATGGCCAGCTGGCCCTGATCCTGGGCCCC  
376 GTGCTGGCCTTGCTGGCCCTGGTGGCCCTGGGTGTCTGGGCCTGTGGCATGTCCGACGGAGGCAGGAGAAGCAG  
451 CGTGGCCTGCACAGCGAGCTGGGAGAGTCCAGTCTCATCCTGAAAGCATCTGAGCAGGGCGACAGCATGTTGGGG  
526 GACCTCCTGGACAGTGACTGCACCACAGGGAGTGGCTCAGGGCTCCCCCTCCTGGTGCAGAGGACAGTGGCACGG  
601 CAGGTTGCCTTGGTGGAGTGTGTGGAAAAGGCCGCTATGGCGAAGTGTGGCGGGGCTTGTGGCACGGTGAGAGT  
676 GTGGCCGTCAAGATCTTCTCCTCGAGGGATGAACAGTCTGGTTCGGGAGACTGAGATCTATAACACAGTGTG  
751 CTCAGACACGACAACATCCTAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTCCCGCAACTCGAGCACGCAGCTGTGGCTC  
826 ATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTACGACTTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTG  
901 AGGCTAGCTGTGTCCGCGCATGCGGCCTGGCGCACCTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCC  
976 ATTGCCACCGCGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAACCTGCAGTGTTCATCGCCGACCTGGGC  
1051 CTGGCTGTGATGCACTCACAGGGCAGCGATTACCTGGACATCGGCAACAACCCGAGAGTGGGCACCAAGCGGTAC  
1126 ATGGCACCCGAGGTGCTGGACGAGCAGATCCGCACGGACTGCTTTGAGTCTACAAGTGGACTGACATCTGGGCC  
1201 TTTGGCCTGGTGTGTTGGGAGATTGCCCGCCGACCATCGTGAATGGCATCGTGGAGGACTATAGACCACCCCTC  
1276 TATGATGTGGTGCCCAATGACCCAGCTTTGAGGACATGAAGAAGTGGTGTGTGGATCAGCAGACCCCCACC  
1351 ATCCCTAACC GGCTGGCTGCAGACCCGGTCTCTCAGGCCTAGCTCAGATGATGCGGGAGTGCTGGTACCCAAAC  
1426 CCCTCTGCCCGACTCACCGCGCTGCGGATCAAGAAGACTACAAAAAATTAGCAACAGTCCAGAGAAGCCTAAA  
1501 GTGATTCAATAG

**Εικόνα 12: Η cDNA αλληλουχία του γονιδίου *ACVRL1*.**



1 -M--T--L--G--S--P--R--K--G--L--L--M--L--L--M--A--L--V--T--Q--G--D--P--V--K--  
26 -P--S--R--G--P--L--V--T--C--T--C--E--S--P--H--C--K--G--P--T--C--R--G--A--W--  
51 -C--T--V--V--L--V--R--E--E--G--R--H--P--Q--E--H--R--G--C--G--N--L--H--R--E--  
76 -L--C--R--G--R--P--T--E--F--V--N--H--Y--C--C--D--S--H--L--C--N--H--N--V--S--  
101 -L--V--L--E--A--T--Q--P--P--S--E--Q--P--G--T--D--G--Q--L--A--L--I--L--G--P--  
126 -V--L--A--L--L--A--L--V--A--L--G--V--L--G--L--W--H--V--R--R--R--Q--E--K--Q--  
151 -R--G--L--H--S--E--L--G--E--S--S--L--I--L--K--A--S--E--Q--G--D--S--M--L--G--  
176 -D--L--L--D--S--D--C--T--T--G--S--G--S--G--L--P--F--L--V--Q--R--T--V--A--R--  
201 -Q--V--A--L--V--E--C--V--G--K--G--R--Y--G--E--V--W--R--G--L--W--H--G--E--S--  
226 -V--A--V--K--I--F--S--S--R--D--E--Q--S--W--F--R--E--T--E--I--Y--N--T--V--L--  
251 -L--R--H--D--N--I--L--G--F--I--A--S--D--M--T--S--R--N--S--S--T--Q--L--W--L--  
276 -I--T--H--Y--H--E--H--G--S--L--Y--D--F--L--Q--R--Q--T--L--E--P--H--L--A--L--  
301 -R--L--A--V--S--A--A--C--G--L--A--H--L--H--V--E--I--F--G--T--Q--G--K--P--A--  
326 -I--A--H--R--D--F--K--S--R--N--V--L--V--K--S--N--L--Q--C--C--I--A--D--L--G--  
351 -L--A--V--M--H--S--Q--G--S--D--Y--L--D--I--G--N--N--P--R--V--G--T--K--R--Y--  
376 -M--A--P--E--V--L--D--E--Q--I--R--T--D--C--F--E--S--Y--K--W--T--D--I--W--A--  
401 -F--G--L--V--L--W--E--I--A--R--R--T--I--V--N--G--I--V--E--D--Y--R--P--P--F--  
426 -Y--D--V--V--P--N--D--P--S--F--E--D--M--K--K--V--V--C--V--D--Q--Q--T--P--T--  
451 -I--P--N--R--L--A--A--D--P--V--L--S--G--L--A--Q--M--M--R--E--C--W--Y--P--N--  
476 -P--S--A--R--L--T--A--L--R--I--K--K--T--L--Q--K--I--S--N--S--P--E--K--P--K--  
501 -V--I--Q--\*

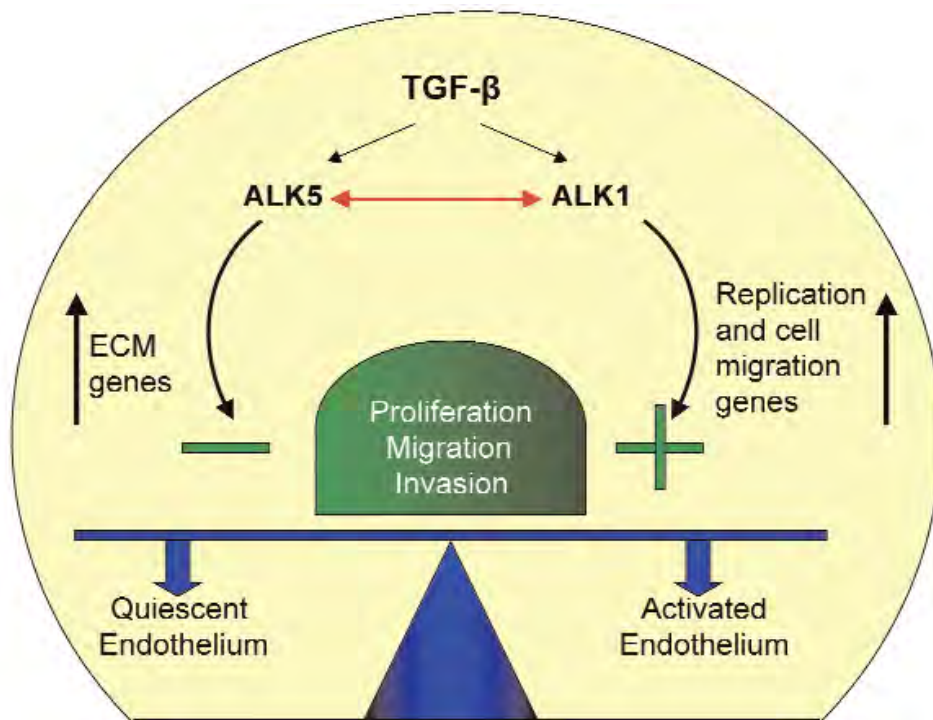
**Εικόνα 12:** Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης *ALK1* που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ACVRL1*.



**Εικόνα 13:** Τρισδιάστατο μοντέλο της εξωκυττάριας περιοχής της πρωτεΐνης *ALK1*.

Ο *ALK1* εμπλέκεται στην αγγειογένεση μέσω της *TGF-β* σηματοδότησης [123,124], και υπάρχουν αποδείξεις πως παίζει μια λειτουργία-κλειδί στην αρτηριακή/φλεβική διαφοροποίηση κατά την εμβρυική αγγειακή ανάπτυξη[125,126]. Ο *ALK1* αλληλεπιδρά με 3 προσδέτες: με τον *TGF-β1* και τον *TGF-β3* σε σύμπλοκο με τον *TβR-II*[127] και με την *BMP9* σε σύμπλοκο με τον *ActRIIA* ή τον *BMPRII*[128]. Ο *TGF-β* μεταφέρει το σήμα από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα μέσω της αλληλεπίδρασης του με αυτά τα ειδικά σύμπλοκα.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν μια μοναδικότητα εφόσον διαθέτουν δύο είδη υποδοχέων *TGF-b/BMP9* τον *ALK1* και τον *ALK5*. Η σημαντικότητα αυτού του πλεονασμού είναι η αντίθετη σηματοδότηση μέσω των δυο αυτών υποδοχέων γεγονός, που αναφέρεται ως “αγγειογενετικός διακόπτης”. Ο *ALK5* αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, και προάγει την διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση. Ο *ALK1* προάγει την διαίρεση των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αναστολή της διαφοροποίησης [64,66,82,84,118,129]. Επιπλέον, ο *ALK1* ενεργοποιεί διαφορετικό σηματοδοτικό μονοπάτι και επάγει την έκφραση διαφορετικών γονιδίων από τον *ALK5*[118,130,131]. Επίσης, ο *ALK1* ανταγωνίζεται ευθέως την σηματοδότηση του *ALK5*[132]. Ωστόσο, άλλες μελέτες έδειξαν, ότι ο *ALK1* συμμετέχει και στην φάση ωρίμανσης της αγγειογένεσης, γεγονός που αφήνει αδιευκρίνιστο τον ακριβή ρόλο του *ALK1*[64,133].



Εικόνα 14: Ο *ALK1* αφού προσδέσει τον *TGF-β* φωσφορυλιώνει τις *SMAD1/5/8* οι οποίες με τη σειρά τους δημιουργούν σύμπλοκο με την *SMAD4* και εισέρχονται στον πυρήνα για να προωθήσουν την γονιδιακή έκφραση. Τα γονίδια στόχοι αυτού του μονοπατιού είναι αρκετά και περιλαμβάνουν τα *Smad6*, *Smad7*, *Id1*, *Id2*, *ENG*, *STAT1*, *IL1RL1* και *Eph-84* (Από Fernández-L et al, 2006).

Η HHT2 προκαλείται από μεταλλάξεις στον γενετικό τόπο του *ALK1*, δηλαδή στο γονίδιο *ACVRL1*. Οι μεταλλάξεις στο *ACVRL1* καλύπτουν το 37% των περιπτώσεων των ασθενών καθώς οι περισσότεροι έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *ENG*[9]. Μέχρι σήμερα 375 μεταλλάξεις έχουν βρεθεί στο γονίδιο *ACVRL1* σύμφωνα με την βάση δεδομένων για την HHT, HHT Mutation Database ([www.hhtmutilation.org](http://www.hhtmutilation.org)), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Location	Mutation Type	Nucleotide Change	Protein Change	Classification
Intron 1	Intronic SNV	c.-34C>T		Benign
Intron 1	Intronic SNV	c.-38C>T		Benign
Exon 2	Deletion/Frameshift	c.31_50del20bp	p.Leu11fs	Pathogenic
Exon 2	Deletion/Frameshift	c.37delC	p.Leu13fs	Pathogenic
Exon 2	Deletion/Frameshift	c.50_53delTGGT	p.Leu17fs	Pathogenic
Exon 2	Insertion/Frameshift	c.50-51insT	p.Leu17fs	Pathogenic
Intron 2	Intronic SNV/Splice Site	c.61+10G>A		
Intron 2	Intronic SNV	c.61+22A>G		Benign
Exon 3	InDel/Frameshift	c.74_78delAGCCGins176bp	p.Lys25fs	Pathogenic
Exon 3-8	Large Deletion	c.61-?_1049+?del	Deletion Exons 3-8	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.77C>T	p.Pro26Leu	Uncertain
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.83delG	p.Arg28fs	Pathogenic
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.86delG	p.Gly29fs	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.88C>T	p.Pro30Ser	
Exon 3	Missense	c.95T>G	p.Val32Gly	
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.100_115del16	p.Cys34fs	Pathogenic
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.100_101insT	p.Cys34fs	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.101G>A	p.Cys34Tyr	
Exon 3	Nonsense	c.102C>A	p.Cys34X	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.106T>C	p.Cys36Arg	
Exon 3	Missense	c.107G>A	p.Cys36Tyr	
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.115_118dupCCAC	p.His40fs	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.121T>C	p.Cys41Arg	Pathogenic

<b>Location</b>	<b>Mutation Type</b>	<b>Nucleotide Change</b>	<b>Protein Change</b>	<b>Classification</b>
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.128_132delGGCCT	p.Gly43fs	Pathogenic
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.129delG	p.Pro44fs	Pathogenic
Exon 3	InDel/Frameshift	c.136_137delTGinsCT	p.Cys46Leu	
Exon 3	Nonsense	c.138C>A	p.Cys46X	Pathogenic
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.139dupC	p.Arg47fs	Pathogenic
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.139_140dupCG	p.Arg47ProfsX7	Pathogenic
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.139_140insG	p.Gly48fs	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.140G>C	p.Arg47Pro	
Exon 3	Missense	c.142G>A	p.Gly48Arg	Pathogenic
Exon 3	Complex	c.143G>A145 delG146_147insT	p.Gly48Glu, Ala49Pro	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.143G>A	p.Gly48Glu	Pathogenic
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.144_145insG	p.Ala49fs	Pathogenic
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.145delG	p.Ala49fs	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.148T>G	p.Trp50Gly	
Exon 3	Nonsense	c.149G>A	p.Trp50X	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.150G>T	p.Trp50Cys	Pathogenic
Exon 3	Nonsense	c.150G>A	p.Trp50X	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.152G>A	p.Cys51Tyr	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.154A>G	p.Thr52Ala	
Exon 3	Deletion/InFrame	c.164_169delTGGTGC	p.Leu55_Val56del	Pathogenic
Exon 3	Nonsense	c.172G>T	p.Glu58X	Pathogenic
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.183delG	p.Arg61fs	Pathogenic

Location	Mutation Type	Nucleotide Change	Protein Change	Classification
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.190delC	p.Gln64fs	Pathogenic
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.191delA	p.Gln64fs	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.197A>C	p.His66Pro	
Exon 3	Missense	c.199C>T	p.Arg67Trp	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.200G>A	p.Arg67Gln	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.202G>T	p.Gly68Cys	
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.203delG	p.Gly68fs	Pathogenic
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.203_204insG	p.Gly68fs	Pathogenic
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.205_209dupTGCGG	p.Gly70fs	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.205T>C	p.Cys69Arg	
Exon 2	Missense	c.206G>T	p.Cys69Phe	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.206G>A	p.Cys69Tyr	
Exon 3	Silent	c.207C>T	p.Cys69Cys	Benign
Exon 3	Missense	c.208G>A	p.Gly70Arg	
Exon 3	Deletion/InFrame	c.214_219delTTGCAC	p.72_73delLeuHis	Suspected Pathogenic
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.215delT	p.Leu72fs	Pathogenic
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.218_219insAA	p.His73Gln fs	Pathogenic
Exon 3	Deletion/InFrame	c.229_240del TGCAGGGGGCGC	p.Cys77_Arg80del	Suspected Pathogenic
Exon 3	Missense	c.230G>A	p.Cys77Tyr	
Exon 3	Missense	c.231C>G	p.Cys77Trp	
Exon 3	Missense	c.235G>A	p.Gly79Arg	
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.237_238insG	p.Arg80fs	Pathogenic

Location	Mutation Type	Nucleotide Change	Protein Change	Classification
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.243delC	p.Pro81fs	Pathogenic
Exon 3	Insertion/Frameshift	c.243_244dupC	p.Thr82fs	Pathogenic
Exon 3	Deletion/InFrame	c.244_246delACC	p.Thr82del	Suspected Pathogenic
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.246delC	p.Thr82fs	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.259C>G	p.His87Asp	
Exon 3	Missense	c.263A>G	p.Tyr88Cys	
Exon 3	Missense	c.265T>C	p.Cys89Arg	Uncertain
Exon 3	Missense	c.266G>A	p.Cys89Tyr	
Exon 3	Nonsense	c.270C>A	p.Cys90X	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.283T>C	p.Cys95Arg	
Exon 3	Missense	c.286A>G	p.Asn96Asp	
Exon 3	Deletion/InFrame	c.289_294delCACAAC	p.His97_Asn98del	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.293A>G	p.Asn98Ser	
Exon 3	Deletion/Frameshift	c.301_307delCTGGTGC	p.Leu101fs	Pathogenic
Exon 3	Intronic SNV	c.313+40G>C		Benign
Intron 3	Intronic SNV	c.313+11C>T		Benign
Intron 3	Intronic SNV	c.313+40G>A		Benign
Intron 3	Splice Defect	c.313+1G>A		Pathogenic
Intron 3	Intronic SNV	c.314-35A>G		Benign
Intron 3	Intronic SNV	c.314-49G>A		Benign
Intron 3	Intronic SNV	c.314-49G>C		Benign
Intron 3	Splice Defect	c.314-3C>G		

<b>Location</b>	<b>Mutation Type</b>	<b>Nucleotide Change</b>	<b>Protein Change</b>	<b>Classification</b>
Exon 4	Large Deletion	EX4del	Deletion Exon 4	Pathogenic
Exon 4	Deletion/Frameshift	c.319delC	p.Gln107fs	Pathogenic
Exon 4	Deletion/Frameshift	c.321delA	p.Glu107fs	Pathogenic
Exon 4	Silent	c.330G>A	p.Ser110Ser	Benign
Exon 4	Nonsense	c.352C>T	p.Gln118X	Pathogenic
Exon 4	Insertion/Frameshift	c.353_360dupAGCTGGCC	p.Leu121fs	Pathogenic
Exon 4	Insertion/Frameshift	c.372_373insCC	p.Pro125fs	Pathogenic
Exon 4	Missense	c.381G>A	p.Leu127Leu	Benign
Exon 4	Missense	c.383C>A	p.Ala128Asp	
Exon 4	Deletion/Frameshift	c.400delG	p.Ala134fs	Pathogenic
Exon 4	Missense	c.401C>A	p.Ala134Asp	Uncertain
Exon 4	Deletion/Frameshift	c.406_409delGGTG	p.Gly136fs	Pathogenic
Exon 4	Nonsense	c.423G>A	p.Trp141X	Pathogenic
Exon 4	Nonsense	c.430C>T	p.Arg144X	Pathogenic
Exon 4	Deletion/Frameshift	c.434delG	p.Arg145fs	Pathogenic
Exon 4	Insertion/Frameshift	c.436dupG	p.Arg146fs	Pathogenic
Exon 4	Nonsense	c.439C>T	p.Gln147X	Pathogenic
Exon 4	Nonsense	c.448C>T	p.Gln150X	Pathogenic
Exon 4	Silent	c.474A>T	p.Gly158Gly	Benign
Exon 4	Nonsense	c.475G>T	p.Glu159X	Pathogenic
Exon 4	Deletion/Frameshift	c.476_477delAG	p.Glu159fs	Pathogenic
Exon 4	Deletion/Frameshift	c.480_481delCA	p.Ser161fs	Pathogenic
Exon 4	Missense	c.481A>G	p.Ser161Gly	Uncertain



<b>Location</b>	<b>Mutation Type</b>	<b>Nucleotide Change</b>	<b>Protein Change</b>	<b>Classification</b>
Exon 4	Missense	c.500C>G	p.Ser167Cys	
Exon 4	Deletion/Frameshift	c.510delC	p.Gly170fs	Pathogenic
Exon 4	Splice Defect	c.525+1delG		Pathogenic
Exon 4	Splice Defect	c.525_525+1delGG		Pathogenic
Intron 4	Intronic SNV	c.525-49G>C		Benign
Intron 4	Splice Defect	c.525+1G>A		Pathogenic
Intron 4	Splice Defect	c.525+2T>C		Pathogenic
Intron 4	Splice Defect ?	c.525+3A>G		Uncertain
Intron 4	Splice Defect ?	c.526-7C>G		
Exon 5	Large Deletion	EX5del	Deletion Exon 5	Pathogenic
Exon 5	Large Deletion	c.526-?_625+?del	Deletion Exon 5	Pathogenic
Exon 5	Deletion/Frameshift	c.526delG	p.Asp176fs	Pathogenic
Exon 5	Missense	c.526G>T	p.Asp176Tyr	
Exon 5	Missense	c.536A>C	p.Asp179Ala	
Exon 5	Insertion/Frameshift	c.540_541insA	p.Asp181fs	Pathogenic
Exon 5	Deletion/Frameshift	c.563delC	p.Thr188fs	Pathogenic
Exon 5	Deletion/Frameshift	c.567delG	p.Gly189fs	Pathogenic
Exon 5	Deletion/Frameshift	c.573delC	p.Phe192fs	Pathogenic
Exon 5	Missense	c.586A>G	p.Arg196Gly	
Exon 5	Missense	c.590C>T	p.Thr197Ile	
Exon 5	Nonsense	c.601C>T	p.Gln201X	Pathogenic
Exon 5	Missense	c.602A>C	p.Gln201Pro	Uncertain
Exon 5	Missense	c.611T>G	p.Leu204Trp	Suspected

Location	Mutation Type	Nucleotide Change	Protein Change	Classification
				Pathogenic
Exon 5	Insertion/Frameshift	c.625_626insTG	p.Gly209fs	Pathogenic
Intron 5	Splice Defect	c.625+1delGinsTTT		
Intron 5	Intronic deletion	c.625+110_130del21		Benign
Intron 5	Intronic insertion	c.626-60_59delGGinsT		Benign
Intron 5	Intronic deletion	c.626-58_60delGGC		Benign
Intron 5	Intronic SNV	c.626-53C>T		Benign
Intron 5	Intronic SNV	c.626-30G>A		Benign
Intron 5	Splice Defect ?	c.626-9_630del GGCCATCAGGAAA		
Intron 5	Splice Defect ?	c.626-6del14		
Intron 5	Splice Defect	c.626-3C>G	r.626_772del r.526_772del	Pathogenic
Exon 6	Missense	c.632G>A	p.Gly211Asp	
Exon 6	Missense	c.632G>C	p.Gly211Ala	
Exon 6	Missense	c.643G>A	p.Glu215Lys	
Exon 6	Missense	c.647T>G	p.Val216Gly	Uncertain
Exon 6	Nonsense	c.650G>A	p.Trp217X	Pathogenic
Exon 6	Nonsense	c.651G>A	p.Trp217X	Pathogenic
Exon 6	Missense	c.656G>A	p.Gly219Asp	
Exon 6	Nonsense	c.662G>A	p.Trp221X	Pathogenic
Exon 6	Nonsense	c.663G>A	p.Trp221X	Pathogenic
Exon 6	Deletion/Frameshift	c.664_668delCACGG	p.His222fs	Pathogenic
Exon 6	Missense	c.666C>T	p.His222His	Benign

Location	Mutation Type	Nucleotide Change	Protein Change	Classification
Exon 6	Missense	c.667G>C	p.Gly223Arg	
Exon 6	Missense	c.670G>A	p.Glu224Lys	
Exon 6	Deletion/Frameshift	c.673_674delAG	p.Ser225fs	Pathogenic
Exon 6	Deletion/Frameshift	c.682delG	p.Val228fs	Pathogenic
Exon 6	Missense	c.683T>A	p.Val228Asp	Uncertain
Exon 6	Missense	c.686A>G	p.Lys229Arg	
Exon 6	Missense	c.686A>T	p.Lys229Met	
Exon 6	Deletion/InFrame	c.696_698delCTC	p.Ser233del	Pathogenic
Exon 6	Missense	c.698C>T	p.Ser233Leu	Pathogenic
Exon 6	Deletion/Frameshift	c.704delA	p.Asp235fs	Pathogenic
Exon 6	Missense	c.709C>A	p.Gln237Lys	
Exon 6	Nonsense	c.709T>C	p.Gly237X	Pathogenic
Exon 6	Nonsense	c.716G>A	p.Trp239X	Pathogenic
Exon 6	Silent	c.747G>A	p.Val249Val	Benign
Exon 6	Deletion/InFrame	c.759_761delCGA	p.Asp254del	Pathogenic
Exon 6	Deletion/InFrame	c.760_762delGAC	p.Asp254del	Pathogenic
Intron 6	Intronic SNV	c.772+21T>A		
Intron 6	Intronic SNV	c.772+24C>T		Benign
Intron 6	Intronic SNV	c.772+27G>C		Benign
Intron 6	Intronic insertion	c.773-59insT		Benign
Intron 6	Splice Defect	c.773-3C>G		Uncertain
Intron 6	Splice Defect	c.773-2A>C		Pathogenic
Intron 6	Splice Defect	c.773-2A>G		Pathogenic

<b>Location</b>	<b>Mutation Type</b>	<b>Nucleotide Change</b>	<b>Protein Change</b>	<b>Classification</b>
Exon 7	Missense	c.778A>C	p.Ile260Leu	
Exon 7	Missense	c.793A>C	p.Thr265Pro	
Exon 7	Deletion/Frameshift	c.810_822del CACGCAGCTGTGG	p.Ser271fs	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.812C>A	p.Thr271Lys	Uncertain
Exon 7	Missense	c.817C>T	p.Leu273Leu	Benign
Exon 7	Missense	c.818T>C	p.Leu273Pro	Uncertain
Exon 7	Nonsense	c.822G>A	p.Trp274X	Pathogenic
Exon 7	Insertion/Frameshift	c.824_825insGGCT	p.Lys273fs	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.827T>C	p.Ile276Thr	
Exon 7	Insertion/Inframe	c.838_846dupCACGAGCAC	p.His280_His282dup	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.838C>A	p.His280Asp	
Exon 7	Nonsense	c.841G>T	p.Glu281X	Pathogenic
Exon 7	Deletion/Frameshift	c.842delA	p.Glu281fs	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.851C>T	p.Ser284Phe	
Exon 7	Missense	c.853C>T	p.Leu285Phe	Pathogenic
Exon 7	Nonsense	c.858C>A	p.Tyr286X	Pathogenic
Exon 7	Nonsense	c.858C>G	p.Tyr286X	Pathogenic
Exon 7	Insertion/Frameshift	c.864_865insT	p.Leu289fs	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.866T>C	p.Leu289Pro	Pathogenic
Exon 7	Deletion/Frameshift	c.870delG	p.Arg291fs	Pathogenic
Exon 7	Nonsense	c.874C>T	p.Gln292X	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.875A>C	p.Gln292Pro	

<b>Location</b>	<b>Mutation Type</b>	<b>Nucleotide Change</b>	<b>Protein Change</b>	<b>Classification</b>
Exon 7	Missense	c.890A>G	p.His297Arg	
Exon 7	Missense	c.899T>C	p.Leu300Pro	
Exon 7	Missense	c.905T>G	p.Leu302Arg	
Exon 7	Deletion/Frameshift	c.913delT	p.Ser305fs	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.913T>C	p.Ser305Pro	
Exon 7	Missense	c.914C>T	p.Ser305Phe	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.916G>C	p.Ala306Pro	
Exon 7	Missense	c.919G>C	p.Ala307Pro	Uncertain
Exon 7	Insertion/Frameshift	c.921_927dupATGCGGC	p.Leu310fs	Pathogenic
Exon 7	Nonsense	c.924C>A	p.Cys308X	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.925G>A	p.Gly309Ser	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.925G>T	p.Gly309Cys	
Exon 7	Missense	c.931G>A	p.Ala311Thr	Uncertain
Exon 7	Splice Site/Silent	c.933G>A	p.Ala311Ala	Uncertain
Exon 7	Missense	c.940C>T	p.His314Tyr	
Exon 7	Missense	c.950T>C	p.Ile317Thr	Uncertain
Exon 7	Missense	c.956G>A	p.Gly319Asp	
Exon 7	Nonsense	c.961C>T	p.Gln321X	Pathogenic
Exon 7	Deletion/Frameshift	c.972delA	p.Pro324fs	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.976A>G	p.Ile326Val	
Exon 7	Missense	c.982C>T	p.His328Tyr	Uncertain
Exon 7	Missense	c.983A>C	p.His328Pro	Uncertain
Exon 7	Missense	c.986G>A	p.Arg329His	Pathogenic

<b>Location</b>	<b>Mutation Type</b>	<b>Nucleotide Change</b>	<b>Protein Change</b>	<b>Classification</b>
Exon 7	Missense	c.988G>A	p.Asp330Asn	
Exon 7	Missense	c.988G>T	p.Asp330Tyr	
Exon 7	Missense	c.992T>C	p.Phe331Ser	
Exon 7	Missense	c.997A>G	p.Ser333Gly	
Exon 7	Missense	c.998G>T	p.Ser333Ile	Pathogenic
Exon 7	InDel/Frameshift	c.1000_1005del CGCAATinsG	p.Arg334Asn335 delfs	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.1007T>A	p.Val336Glu	Uncertain
Exon 7	Deletion/Frameshift	c.1010delT	p.Leu337fs	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.1010T>C	p.Leu337Pro	
Exon 7	Missense	c.1023C>G	p.Asn341Lys	
Exon 7	Missense	c.1025T>C	p.Leu342Pro	Uncertain
Exon 7	Nonsense	c.1027C>T	p.Gln343X	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.1030T>C	p.Cys344Arg	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.1031G>A	p.Cys344Tyr	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.1031G>T	p.Cys344Phe	
Exon 7	Missense	c.1039G>C	p.Ala347Pro	
Exon 7	Deletion/Frameshift	c.1042delG	p.Asp348fs	Pathogenic
Exon 7	Missense	c.1046T>G	p.Leu349Arg	Uncertain
Exon 7	Missense	c.1048G>C	p.Gly350Arg	Suspected Pathogenic
Exon 7	Missense	c.1048G>A	p.Gly350Ser	
Intron 7	Splice Defect	c.1048+1G>C		Suspected Pathogenic

Location	Mutation Type	Nucleotide Change	Protein Change	Classification
Intron 7	Splice Defect	c.1048+1G>A		Suspected Pathogenic
Intron 7	Splice Defect	c.1048+5G>A		Suspected Pathogenic
Intron 7	Splice Defect	c.1048+5G>T		Suspected Pathogenic
Intron 7	Intronic deletion	c.1048+55_58delTCTC		Benign
Intron 7	Intronic InDel	c.1049-4_1049-2delACAinsCC		
Exon 8	Missense	c.1054G>C	p.Ala352Pro	
Exon 8	Missense	c.1055C>A	p.Ala352Asp	Pathogenic
Exon 8	Silent	c.1060C>T	p.Leu354Leu	Benign
Exon 8	Deletion/Frameshift	c.1061_1068delTGCACTCA	p.Met354fs	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1061T>A	p.Met354Lys	
Exon 8	Nonsense	c.1069C>T	p.Gln357X	Pathogenic
Exon 8	Deletion/Frameshift	c.1071delG	p.Gln357fs	Pathogenic
Exon 8	Insertion/Frameshift	c.1080_1099dup GCACTCACAGGGCAGCGAT	p.Tyr361fs	Pathogenic
Exon 8	Silent	c.1092C>T	p.Ile364Ile	Benign
Exon 8	Deletion/Frameshift	c.1107_1108delAG	p.Arg369fs	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1111G>A	p.Gly371Ser	Uncertain
Exon 8	Insertion/Frameshift	c.1112_1113dupG	p.Gly371fs	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1112G>T	p.Gly371Val	Uncertain
Exon 8	Missense	c.1115C>T	p.Thr372Ile	
Exon 8	Deletion/InFrame	c.1120_1137del18	p.Arg374_Glu379del	Pathogenic
Exon 3	Missense	c.1120C>T	p.Arg374Trp	Pathogenic

<b>Location</b>	<b>Mutation Type</b>	<b>Nucleotide Change</b>	<b>Protein Change</b>	<b>Classification</b>
Exon 7	Missense	c.1121G>A	p.Arg374Gln	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1123T>C	p.Tyr375His	Uncertain
Exon 8	Insertion/Frameshift	c.1125_1126insGTAC	p.Met376fs	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1126A>G	p.Met376Val	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1127T>G	p.Met376Arg	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1127T>A	p.Met376Lys	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1127T>C	p.Met376Thr	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1129G>A	p.Ala377Thr	Uncertain
Exon 8	Missense	c.1130C>T	p.Ala377Val	Uncertain
Exon 8	Missense	c.1131A>G	p.Ala377Ala	Uncertain
Exon 8	Missense	c.1132C>T	p.Pro378Ser	Uncertain
Exon 8	Missense	c.1133C>A	p.Pro378His	
Exon 8	Missense	c.1133C>T	p.Pro378Leu	
Exon 8	Missense	c.1135G>A	p.Glu379Lys	Suspected Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1139T>G	p.Val380Gly	
Exon 8	Missense	c.1144G>C	p.Asp382His	Uncertain
Exon 8	Missense	c.1157G>A	p.Arg386His	
Exon 8	Missense	c.1166G>A	p.Cys389Tyr	
Exon 8	Nonsense	c.1171G>T	p.Glu391X	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1187C>A	p.Thr396Asn	Suspected Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1189G>A	p.Asp397Asn	
Exon 8	Missense	c.1190A>G	p.Asp397Gly	



<b>Location</b>	<b>Mutation Type</b>	<b>Nucleotide Change</b>	<b>Protein Change</b>	<b>Classification</b>
Exon 8	Missense	c.1193T>A	p.Ile398Asp	
Exon 8	Missense	c.1196G>C	p.Trp399Ser	
Exon 8	Missense	c.1199C>A	p.Ala400Glu	
Exon 8	Missense	c.1204G>A	p.Gly402Ser	
Exon 8	Missense	c.1205 G>A	p.Gly402Asp	
Exon 8	Missense	c.1208T>C	p.Leu403Pro	
Exon 8	Missense	c.1214T>A	p.Leu405Gln	Suspected Pathogenic
Exon 8	Deletion/Frameshift	c.1215delG	p.Leu405fs	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1218G>C	p.Trp406Cys	
Exon 8	Missense	c.1218G>T	p.Trp406Cys	
Exon 8	Missense	c.1220A>G	p.Glu407Gly	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1221G>T	p.Glu407Asp	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1231C>T	p.Arg411Trp	Uncertain
Exon 8	Missense	c.1232G>A	p.Arg411Gln	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1232G>C	p.Arg411Pro	Pathogenic
Exon 8	Missense	c.1246G>A	p.Gly416Ser	Uncertain
Intron 8	Splice Defect	c.1246+1G>A		Pathogenic
Intron 8	Splice Defect	c.1246+2T>G		Pathogenic
Intron 8	Splice Defect ?	c.1246+5G>A		
Intron 8	Splice Defect ?	c.1246+9C>T		Uncertain
Intron 8	Intronic SNV	c.1246+19C>T		Uncertain
Intron 8	Intronic SNV	c.1247-86_84ATA>TAT		Benign

Location	Mutation Type	Nucleotide Change	Protein Change	Classification
Exon 9-10	Large Deletion	c.1247_1512del	p.Gly416_Gln503del	Pathogenic
Exon 9-10	Large Deletion	EX9_10del	Deletion Exons 9-10	Pathogenic
Exon 9	Missense	c.1249A>T	p.Ile417Phe	Uncertain
Exon 9	Deletion/Frameshift	c.1250_1269del20	p.Ile417 fs	Pathogenic
Exon 9	Missense	c.1261 T>G	p.Tyr421Asp	
Exon 9	Deletion/Frameshift	c.1269delA	p.Phe425fs	Pathogenic
Exon 9	Missense	c.1270C>A	p.Pro424Thr	
Exon 9	Missense	c.1270C>T	p.Pro424Ser	
Exon 9	Missense	c.1271C>T	p.Pro424Leu	
Exon 9	Missense	c.1273T>G	p.Phe425Val	
Exon 9	Deletion/InFrame	c.1274_1276delTCT	p.Phe425del	
Exon 9	Missense	c.1275C>G	p.Phe425Leu	
Exon 9	Missense	c.1276A>G	p.Tyr426Cys	
Exon 9	Missense	c.1280A>T	p.Asp427Val	
Exon 9	Missense	c.1297C>T	p.Pro433Ser	
Exon 9	Missense	c.1298C>G	p.Pro433Arg	
Exon 9	Deletion/Frameshift	c.1299delC	p.Pro433fs	Pathogenic
Exon 9	InDel/Frameshift	c.1302_1303delCTinsA	p.Ser434fs	Pathogenic
Exon 9	Deletion/Frameshift	c.1309delG	p.Asp437fs	Pathogenic
Exon 9	Missense	c.1310A>G	p.Asp437Gly	Uncertain
Exon 9	Missense	c.1313T>G	p.Met438Arg	Pathogenic
Exon 9	Missense	c.1313T>C	p.Met438Thr	

<b>Location</b>	<b>Mutation Type</b>	<b>Nucleotide Change</b>	<b>Protein Change</b>	<b>Classification</b>
Exon 9	Nonsense	c.1315A>T	p.Lys440X	Pathogenic
Exon 9	Deletion/InFrame	c.1318_1320delAAG	p.Lys440del	
Exon 9	Missense	c.1321G>A	p.Val441Met	
Exon 9	Deletion/InFrame	c.1324_1326delGTG	p.Val442del	Uncertain
Exon 9	Missense	c.1325T>C	p.Val442Ala	Uncertain
Exon 9	Insertion/Frameshift	c.1332_1333insTG	p.Asp445fs	Pathogenic
Exon 9	Nonsense	c.1336C>T	p.Gln446X	Pathogenic
Exon 9	Missense	c.1346C>T	p.Pro449Leu	
Exon 9	Insertion/Frameshift	c.1347_1348insC	Framehift	Pathogenic
Exon 9	Missense	c.1355C>T	p.Pro452Leu	Pathogenic
Exon 9	Missense	c.1377G>A	p.Pro459Pro	Uncertain
Intron 9	Splice Defect	c.1377+1G>A		Pathogenic
Intron 9	Intronic SNV	c.1377+45T>C		Benign
Intron 9	Intronic SNV	c.1378-68A>G		Benign
Intron 9	Intronic SNV	c.1378-62C>A		Benign
Intron 9	Intronic SNV	c.1378-30T>C		Benign
Intron 9	Splice Defect	c.1378-2A>G		Pathogenic
Intron 9	Splice Defect	c.1378-1G>T		Pathogenic
Exon 10	Large Deletion	EX10del	Deletion Exon 10	Pathogenic
Exon 10	Deletion/InFrame	c.1378_1512del	p.Val460_Gln503del	
Exon 10	Nonsense	c.1385C>G	p.Ser462X	Pathogenic
Exon 10	Nonsense	c.1396C>T	p.Gln466X	Pathogenic
Exon 10	Nonsense	c.1408G>T	p.Glu470X	Pathogenic

Location	Mutation Type	Nucleotide Change	Protein Change	Classification
Exon 10	Missense	c.1411T>C	p.Cys471Arg	
Exon 10	Nonsense	c.1413C>A	p.Cys471X	Pathogenic
Exon 10	Insertion/Frameshift	c.1428_1429dupC	p.Ser477fs	Pathogenic
Exon 10	Nonsense	c.1435C>T	p.Arg479X	Pathogenic
Exon 10	Missense	c.1436G>A	p.Arg479Gln	Pathogenic
Exon 10	Missense	c.1436G>C	p.Arg479Pro	Uncertain
Exon 10	Missense	c.1436G>T	p.Arg479Leu	
Exon 10	Missense	c.1438C>T	p.Leu480Phe	Uncertain
Exon 10	Missense	c.1445C>T	p.Ala482Val	Benign
Exon 10	Missense	c.1450C>T	p.Arg484Trp	
Exon 10	Complex	c.1450C>T1450_1451insG	p.Arg484Trpfs	Pathogenic
Exon 10	Missense	c.1451G>A	p.Arg484Gln	Suspected Pathogenic
Exon 10	Missense	c.1452G>A	p.Arg484Arg	
Exon 10	Insertion/Frameshift	c.1452insA	p.Ile485fs	Pathogenic
Exon 10	Deletion/InFrame	c.1460_1462delAGA	p.487delLys	Uncertain
Exon 10	Missense	c.1460A>C	p.Lys487Thr	
Exon 10	Nonsense	c.1468C>T	p.Gln490X	Pathogenic
Exon 10	Missense	c.1475T>A	p.Ile492Asn	
3'UTR	Intronic SNV	c.1512+58G>A		Benign

Πίνακας 4: Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μεταλλάξεις, που έχουν βρεθεί, για το γονίδιο *ACVRL1* και οι οποίες είναι καταχωρημένες στην βάση δεδομένων για την HHT (HHT mutation database, [http://arup.utah.edu/database/ACVRL1/ACVRL1\\_display.php](http://arup.utah.edu/database/ACVRL1/ACVRL1_display.php)). Η πρώτη στήλη δείχνει την περιοχή της μετάλλαξης, η δεύτερη τον τύπο της μετάλλαξης, η τρίτη και η τέταρτη την νουκλεοτιδική και πρωτεϊνική αλλαγή της αλληλουχίας και η πέμπτη το αν είναι παθογενής ή όχι αυτή η αλλαγή. Η ύπαρξη κενών κελιών υποδηλώνει την έλλειψη πληροφοριών για την συγκεκριμένη αλλαγή.

Όπως φαίνεται από τον πίνακα οι μεταλλάξεις αφορούν παρανοηματικές υποκαταστάσεις, μη νοηματικές υποκαταστάσεις, διαγραφές, ενθέσεις, σύνθετες και μεταλλάξεις θέσεων συρραφής εξονίων. Οι περίπου μισές από τις μεταλλάξεις (n=177, 47%) αφορούν παρανοηματικές υποκαταστάσεις, το 16% αφορούν διαγραφές και αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης, 8% ενθέσεις και μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης, 12% μη νοηματικές υποκαταστάσεις, 6% στις θέσεις ματίσματος, και οι υπόλοιπες αφορούν απλές αλλαγές πλαισίου ανάγνωσης, σύνθετες αλλαγές πλαισίου ανάγνωσης και in-frame διαγραφές. Επίσης, στο 11% των μεταλλάξεων δεν έχει διευκρινιστεί η επίπτωση τους. Το 23% των μεταλλάξεων βρίσκεται στην εξωκυττάρια περιοχή του *ALK1*, που αποτελείται από τα εξόνια 2 και 3, το 13% στην διαμεμβρανική περιοχή, που περιλαμβάνει το εξόνιο 4 και το 65% των μεταλλάξεων βρίσκεται στην ενδοκυτταρική περιοχή, που περιέχει τα εξόνια 5-10. Στο εξόνιο 2 ανακαλύφθηκαν ως τώρα 3 μεταλλάξεις και στο εξόνιο 3 61 μεταλλάξεις εκ των οποίων αρκετές οδηγούν σε σχηματισμό κωδικονίων λήξης. Στο εξόνιο 4 έχουν βρεθεί 22 μεταλλάξεις, οι οποίες επίσης επί το πλείστον δημιουργούν κωδικόνια λήξης. 10 μεταλλάξεις υπάρχουν στο εξόνιο 5, που περιέχει το υψηλά διατηρημένο μοτίβο GS. Οι περισσότερες μεταλλάξεις εντοπίζονται στην περιοχή κινάσης. Συγκεκριμένα στο εξόνιο 6 αναφέρονται 21 μεταλλάξεις, 53 στο εξόνιο 7, 42 στο εξόνιο 8, 23 στο εξόνιο 9 και 15 στο εξόνιο 10. Οι περισσότερες από αυτές οδηγούν σε σχηματισμό κωδικονίων λήξης ως αποτέλεσμα μη νοηματικών μεταλλάξεων, ενθέσεων/διαγραφών, και μεταλλάξεων θέσεων ματίσματος. Πολλές μεταλλάξεις όμως προκαλούνται από αντικαταστάσεις βάσεων. Επίσης αναφέρονται και 31 πολυμορφισμοί.

Αυτές οι μεταλλάξεις και οι πολυμορφισμοί είναι αποτέλεσμα της χαρτογράφησης του γονιδίου *ACVRL1*, που έχει πραγματοποιηθεί σε αρκετές χώρες στον κόσμο. Στην Ευρώπη έχουν γίνει έρευνες στην Ισπανία[134-137], στη Γερμανία[138-144], στη Δανία[145,146], στην Ολλανδία[147], στην Ιταλία[148,149] και στη Γαλλία[150,151]. Μελέτες έγιναν επίσης στον Καναδά[152] και στη Βραζιλία[153], καθώς και στην Κίνα[154-156] και στην Κορέα[157].

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1) ΥΛΙΚΟ**

#### ***2.1.1) Κλινική διάγνωση πασχόντων***

Η εύρεση και η αναγνώριση πασχόντων ατόμων έγινε με βάση τα διαγνωστικά κριτήρια Curacao, όπως αυτά περιγράφηκαν παραπάνω στην εισαγωγή[40]. Αρχικά τα άτομα υποβλήθηκαν σε φυσική εξέταση για την διαπίστωση της κλινικής τους εικόνας και συγκεκριμένα για την ύπαρξη δύο ή τριών από τα εξής κλινικά συμπτώματα:

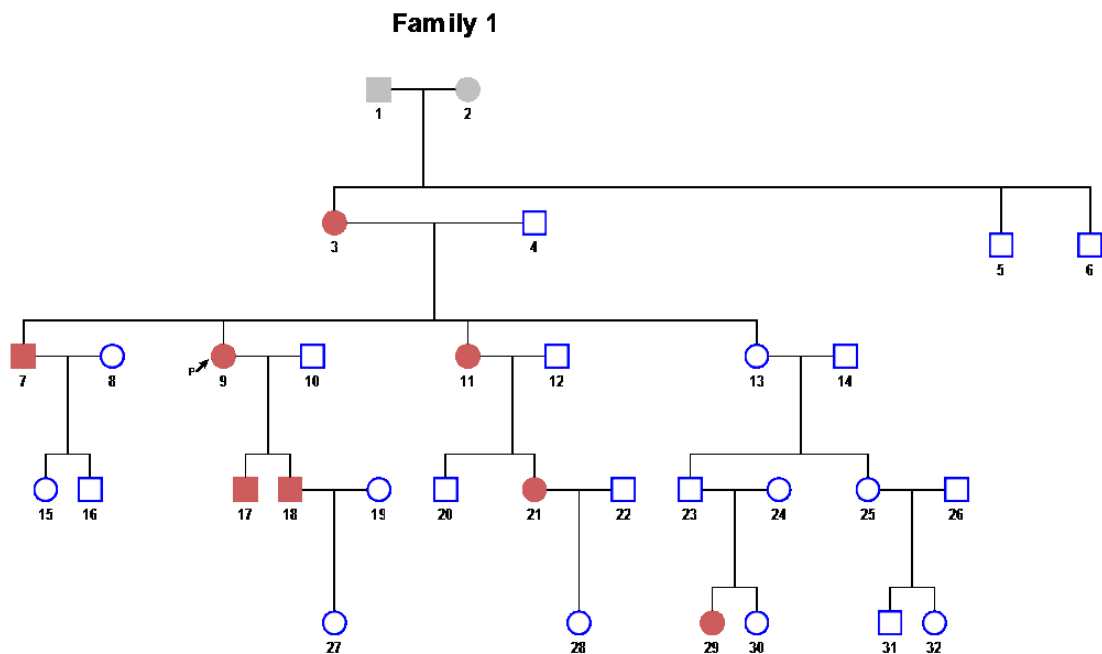
- ✓ Αυτόματες υποτροπιάζουσες ρινορραγίες
- ✓ Βλεννογονικές τηλαγγειεκτασίες του προσώπου, των ζυγωματικών, της μύτης και του μετώπου
- ✓ Δερματικές τηλεγγειεκτασίες δακτύλων
- ✓ Αναιμία

Έπειτα υπήρξε καταγραφή πλήρους ατομικού αναμνηστικού, συνοδών προβλημάτων, και επιπλοκών. Εν συνεχεία, καταγράφηκε πλήρες οικογενειακό ιστορικό και κατασκευάστηκαν τα γενεαλογικά δένδρα. Τα άτομα, που δεν πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια Curacao αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Ως πιθανώς πάσχοντες μελετήθηκαν τα άτομα στα οποία υπήρχαν 2 από τα 3 βασικά διαγνωστικά κριτήρια, ενώ τέλος τα άτομα, που είχαν πλήρη κλινική εκδήλωση των κριτηρίων αυτών μελετήθηκαν ως επιβεβαιωμένοι ασθενείς ORW. Για την ανίχνευση αγγειακών δυσπλασιών στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και στον πνεύμονα χρησιμοποιήθηκε MRI αγγειογραφία. Ενδοσκόπηση στομάχου και παχέως εντέρου χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό τηλαγγειεκτασιών στο πεπτικό. Μελετήθηκαν 7 οικογένειες και 3 ανεξάρτητα άτομα.

## 2.1.2) Οικογενειακά ιστορικά και γενεαλογικά δέντρα:

### Οικογένεια 1:

Το άτομο δείκτης στην οικογένεια 1 (Εικόνα 16) είναι μια γυναίκα 75 ετών, η οποία εμφάνισε ρινορραγίες σε τακτική βάση στην ηλικία των 20 ετών. Η γυναίκα φέρει τηλαγγειεκτασίες δακτύλων, προσώπου και βλεννογόνων. Παρουσιάζει αναιμία και έχει οικογενειακό ιστορικό καθώς και οι δύο υιοί της νοσούν, όπως επίσης και η μητέρα της.

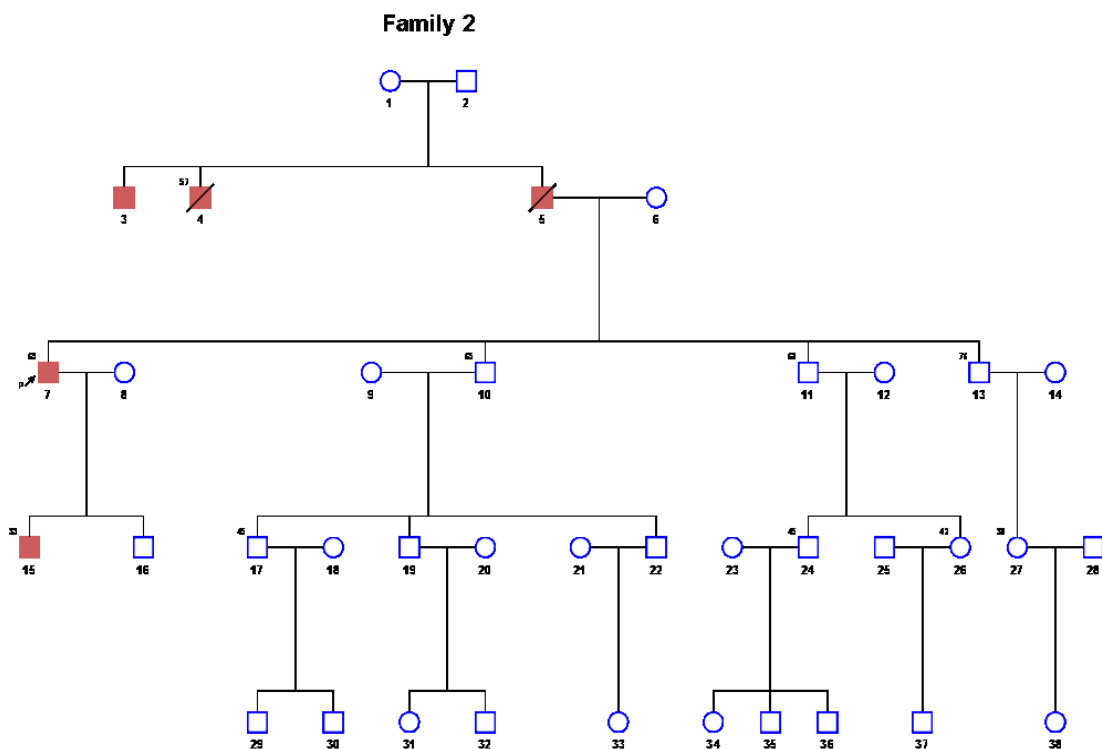


Εικόνα 15: Γενεαλογικό δένδρο της οικογένειας 1. Το άτομο-δείκτης υποδεικνύεται με βέλος.



## Οικογένεια 2:

Όπως φαίνεται στην εικόνα 17, το άτομο δείκτης είναι το άτομο 7, το οποίο είναι ένας άνδρας 70 ετών. Ο άνδρας έχει κλινική εικόνα με ρινορραγίες αρκετά συχνές, τηλαγγειεκτασίες στους βλεννογόνους και στα δάκτυλα καθώς και αναιμία. Επίσης ο υιός του πάσχει από ΗΗΤ καθώς στην ηλικία των 40 ετών εμφανίζει ρινορραγίες αρκετά συχνές, και τηλαγγειεκτασίες βλεννογόνου.



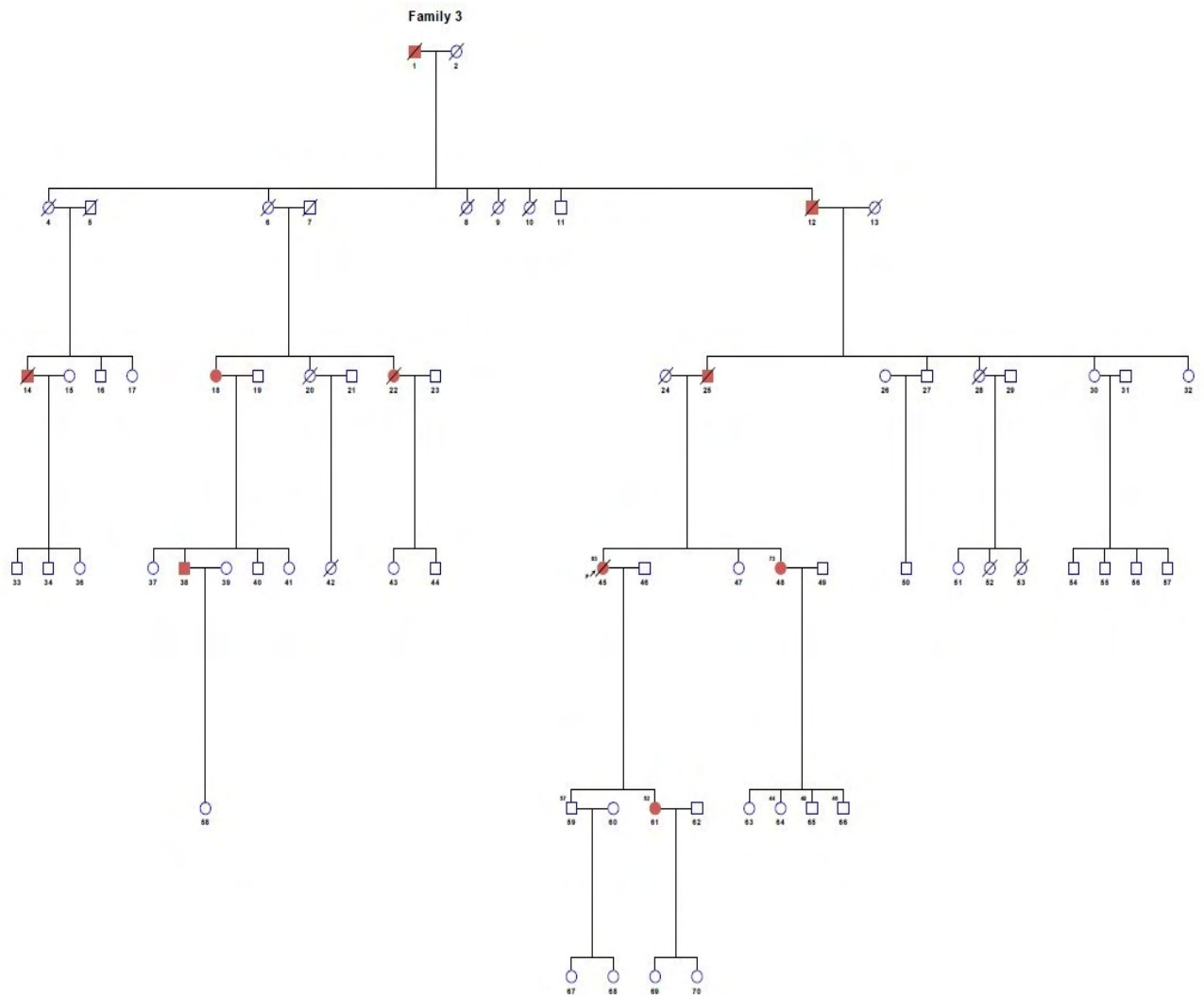
Εικόνα 16: Γενεαλογικό δένδρο της οικογενείας 2. Το άτομο-δείκτης υποδεικνύεται με βέλος.

### Οικογένεια 3:

Η οικογένεια 3 είναι μια μεγάλης έκτασης, όσον αφορά το γενεαλογικό της δέντρο, οικογένεια, που περιλαμβάνει 6 γενεές. Το άτομο δείκτης αυτής της οικογένειας ήταν μια γυναίκα 83 ετών (άτομο 43, τέταρτη γενιά, Εικ. 17), η οποία είχε εμφανίσει τα πρώτα συμπτώματα της στην ηλικία των 18 ετών. Κύρια χαρακτηριστικά της κλινικής της εικόνας ήταν οι συχνές αυτόματες υποτροπιάζουσες ρινορραγίες, με συχνότητα 1-2 φορές εβδομαδιαίως, οι βλεννογονικές τηλαγγειεκτασίες του προσώπου, των ζυγωματικών και του μετώπου, οι δερματικές τηλαγγειεκτασίες δακτύλων και η σιδηροπενική αναιμία. Η ασθενής εμφανίζει έντονο οικογενειακό ιστορικό με τον προπάππου της να πεθαίνει από τη νόσο καθώς και τον παππού και τον πατέρα της παρομοίως. Επίσης, η αδελφή της και η κόρη της φέρονται να ασθενούν ενώ επιπλέον υπάρχουν και άλλα άτομα, τα οποία πιθανό ασθενούν αλλά δεν υπήρξε δυνατότητα συλλογής δειγμάτων.

Το άτομο δείκτης αυτής της οικογένειας εμφανίζει επιπλέον ρευματικό πυρετό, στένωση αορτικής βαλβίδος, υποθυρεοειδισμό, κεφαλαλγία, δύσπνοια, υποξυγοναιμία (η μέτρηση έγινε μέσω παλμικής οξυγονομετρίας δακτύλου), συχνές λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος, υπερκινητική κυκλοφορία, καρδιακή ανεπάρκεια, ηπατική ανεπάρκεια και επαναλαμβανόμενες και υποτροπιάζουσες αιμορραγίες ανωτέρου πεπτικού συστήματος. Η ωτορινολαρυγγική έδειξε την ύπαρξη αγγειοδυσπλασιών στο διάφραγμα καθώς και ρήξη αυτού. Από την γαστρεντερολογική εξέταση βρέθηκαν αιμορραγικές αγγειοδυσπλασίες στο στομάχι, ενώ οι καρδιολογικές εμφάνισαν καρδιακή ανεπάρκεια NYHA II. Απεικονιστικοί έλεγχοι έγιναν στον εγκέφαλο, τα πνευμονικά αγγεία και το ήπαρ, με τα μόνα ευρήματα να εντοπίζονται στην περιοχή του ήπατος όπου βρέθηκε ανομοιογενής πολυλοβωτή παρυφή.

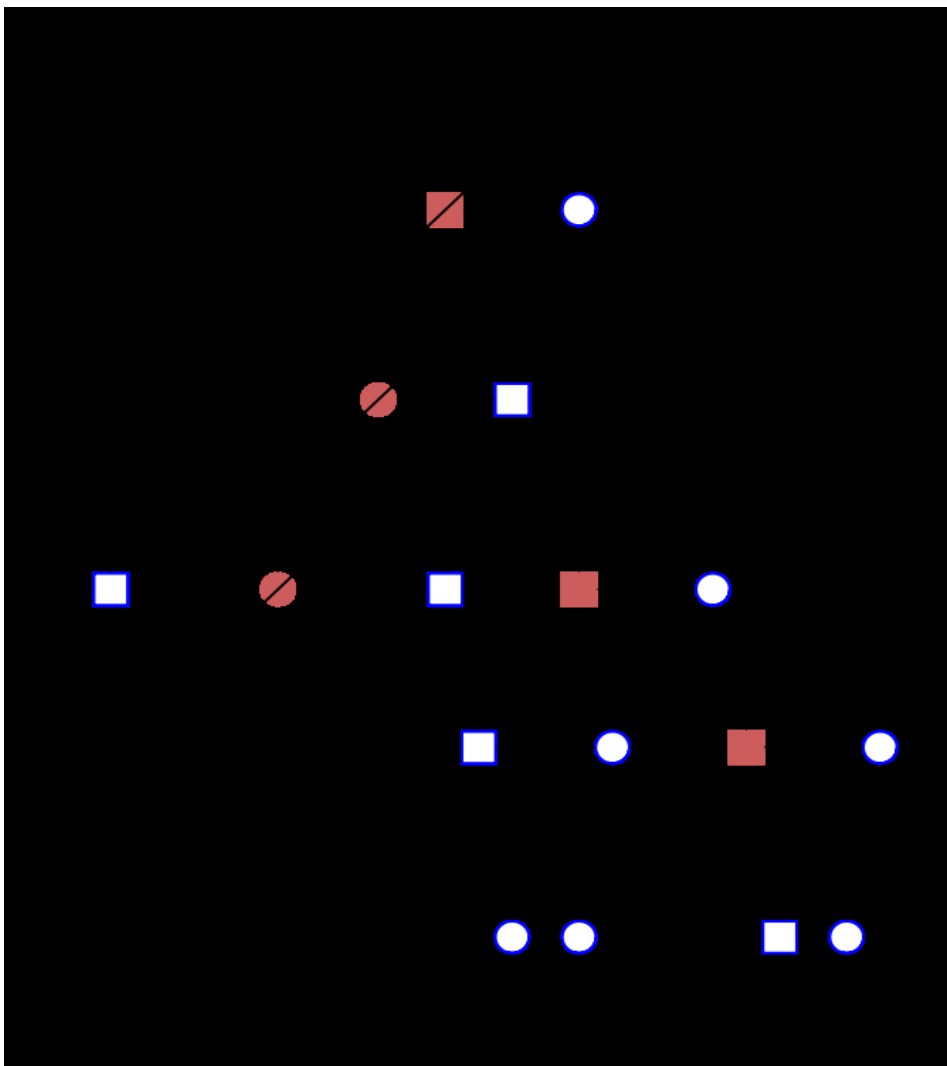
Η κλινική εικόνα της αδερφής του ατόμου δείκτη, είναι παρόμοια με αυτή του ατόμου δείκτη. Η γυναίκα, ετών 75, παρουσιάζει, αυτόματες υποτροπιάζουσες ρινορραγίες μεγάλης συχνότητας, βλεννογονικές αγγειεκτασίες προσώπου, δερματικές αγγειεκτασίες δακτύλων και σοβαρή αναιμία.



**Εικόνα 17: Γενεαλογικό δένδρο της οικογενείας 3. Το άτομο-δείκτης υποδεικνύεται με βέλος.**

#### Οικογένεια 4:

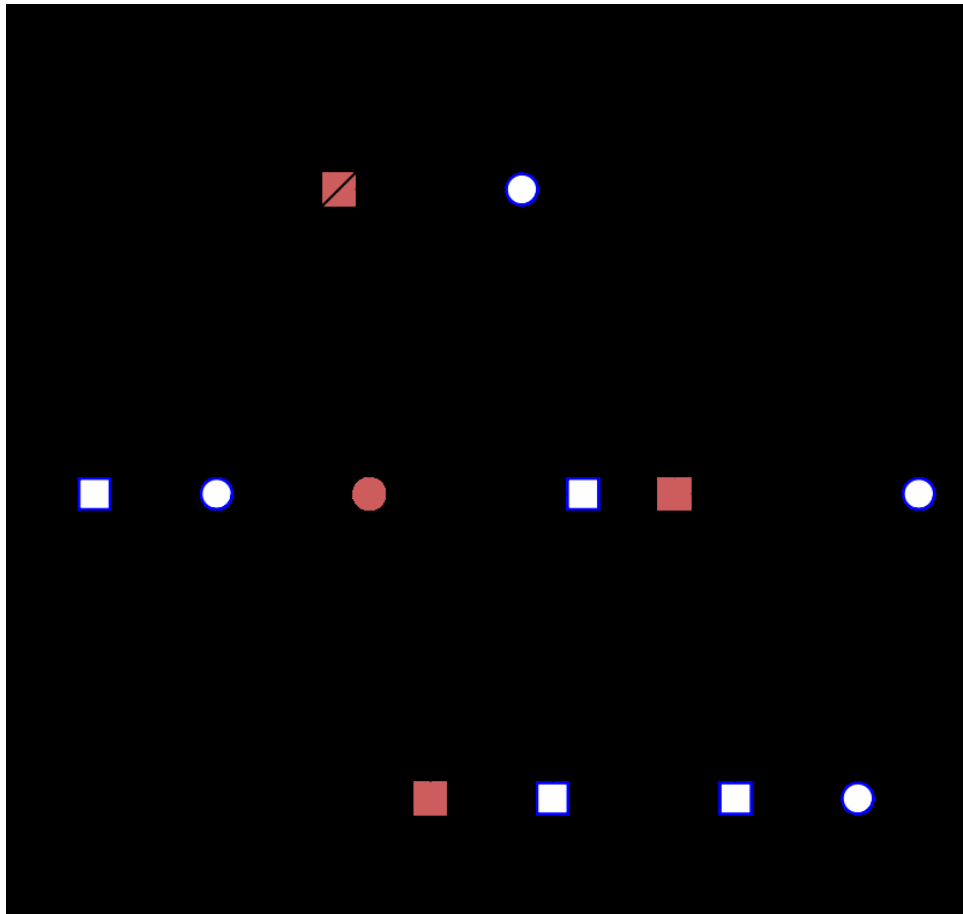
Το άτομο-δείκτης, αυτής της οικογένειας, είναι ένας άνδρας ηλικίας 78 ετών, ο οποίος εμφάνιζε τη βασική κλινική εικόνα της ΗΗΤ, με ρινορραγίες, δερματικές και βλεννογονικές τηλαγγειεκτασίες και σοβαρή αναιμία. Επίσης, υπάρχει έντονο οικογενειακό ιστορικό της ασθένειας, την οποία εμφάνισαν και άλλα μέλη της οικογένειας όπως φαίνεται στην Εικόνα 19, με τον παππού και τη μητέρα του να έχουν πεθάνει λόγω της νόσου. Επίσης, νοσεί η αδελφή του ατόμου-δείκτη, καθώς και ο υιός του. Δεν υπάρχει απεικονιστικός έλεγχος για κανένα από τα μέλη που νοσούν σε αυτή την οικογένεια.



### Οικογένεια 5:

Το άτομο δείκτης στην οικογένεια 11 είναι το 3<sup>ο</sup> άτομο της δεύτερης γενεάς στο γενεαλογικό δέντρο (άτομο 5, Εικόνα 20). Το άτομο είναι μια γυναίκα 52 ετών, στην οποία τα πρώτα συμπτώματα του συνδρόμου εμφανίστηκαν στην εφηβική ηλικία. Η γυναίκα παρουσιάζει μια κλινική εικόνα βαριάς μορφής, με κύρια κλινικά χαρακτηριστικά τις αυτόματες υποτροπιάζουσες ρινορραγίες, τις βλεννογονικές τηλαγγειεκτασίες στη σκληρά υπερώα, τις δερματικές τηλεγγειεκτασίες στα δάχτυλα των χεριών της καθώς και αναιμία. Υπάρχει οικογενειακό ιστορικό καταγεγραμμένο, με τρία επιπλέον μέλη της οικογένειας να νοσούν, τον πατέρα της, ο οποίος έχει πεθάνει λόγω ασθενείας, τον αδερφό της και ένας από τους δύο υιούς της. Επιπλέον επιλοκές και συμπτώματα που εμφανίζει η γυναίκα είναι ο μετεγχειρητικός υποθυρεοειδισμός, καθώς πραγματοποιήθηκε θυρεοειδεκτομή λόγω πιθανής αυτόματης αιμορραγίας του θυρεοειδούς αδένα, κεφαλαλγία, δύσπνοια με παράταση εκπνοής και μουσικούς ρόγχους, συχνές λοιμώξεις αναπνευστικού συστήματος και υπερκινητική κυκλοφορία. Στην ασθενή πραγματοποιήθηκαν και απεικονιστικές εξετάσεις με μαγνητικές τομογραφίες (MRA/MRI) στον εγκέφαλο, στα πνευμονικά αγγεία και στο ήπαρ. Στον εγκέφαλο οι απεικονίσεις έδειξαν ξανθοκοκκιώματα στους χοριοειδείς κόλπους, ενώ οι απεικονίσεις στους πνεύμονες και στο ήπαρ δεν έδειξαν κάποιο εύρημα.

Το άτομο 7 είναι αδερφός της γυναίκας δείκτη ατόμου και παρουσιάζει εξίσου σημαντική κλινική εικόνα. Ο άντρας, 54 ετών, εμφάνισε τα πρώτα συμπτώματα στην ηλικία των 35 ετών. Τα βασικά κλινικά χαρακτηριστικά του είναι οι αυτόματες υποτροπιάζουσες ρινορραγίες οι οποίες έχουν συχνότητα 3-4 φορές το χρόνο, οι βλεννογονικές τηλαγγειεκτασίες στη σκληρά υπερώα και οι δερματικές τηλαγγειεκτασίες στα ζυγωματικά, στη μύτη και στα δάκτυλα. Συνοδά συμπτώματα του ατόμου αυτού είναι η κατάλιψη, τα χρόνια διαλείποντα περιστατικά κωλικού κοιλίας, η κεφαλαλγία, η αρτηριακή υπέρταση, ο αιθυλισμός, η χολολιθίαση και η υπερκινητική κυκλοφορία. Ο ενδοσκοπικός έλεγχος του ανωτέρου πεπτικού συστήματος έδειξε την παρουσία γαστρικών αγγειοδυσπλασιών. Οι απεικονιστικοί έλεγχοι στον εγκέφαλο και τα πνευμονικά αγγεία βγήκαν χωρίς ευρήματα ενώ στη μαγνητική τομογραφία ήπατος υπήρξε προσκόλληση του σκιαγραφικού στο τοίχωμα της χοληδόχου κύστεως, το οποίο είναι ένα άτυπο μοτίβο ύπαρξης αγγειοδυσπλασίας.



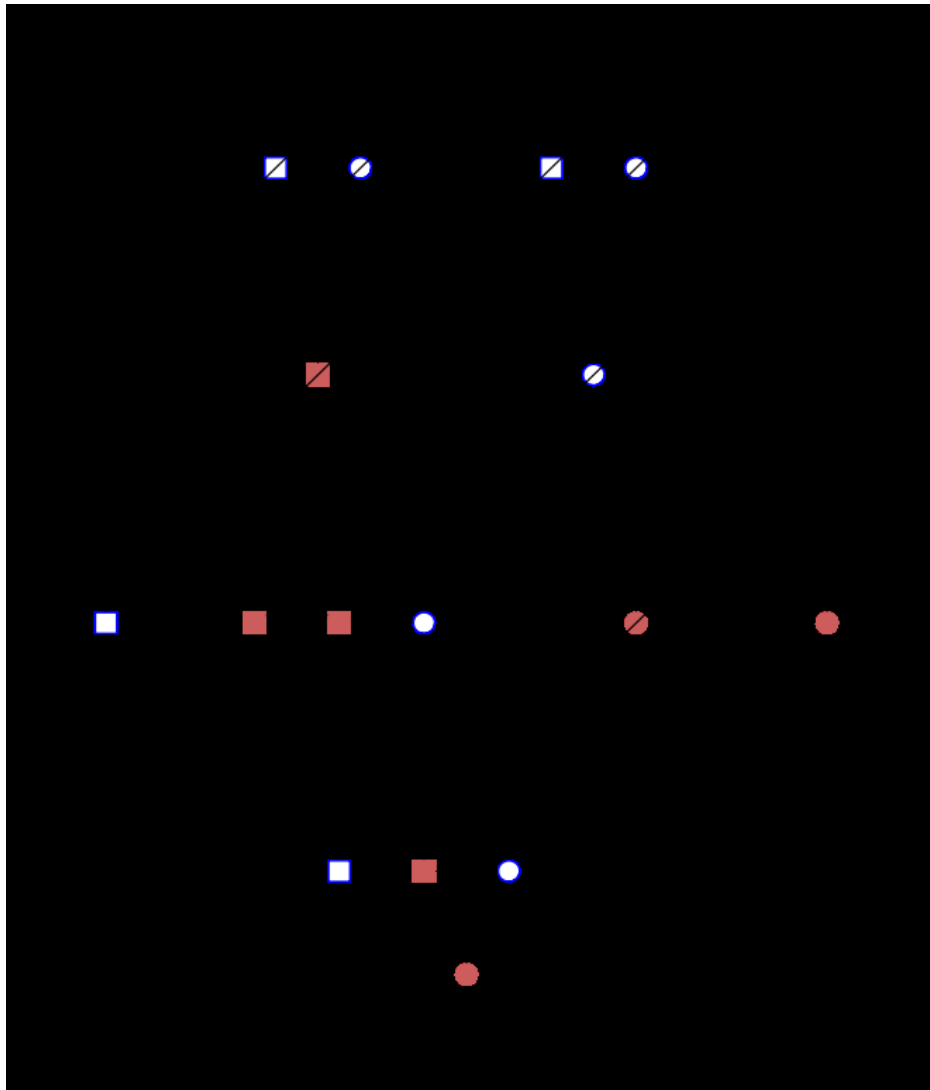
Εικόνα 19: Γενεαλογικό δένδρο της οικογενείας 5.

### **Οικογένεια 6:**

Το άτομο 3 της 3<sup>ης</sup> γενεάς είναι το άτομο δείκτης της οικογένειας αυτής (Εικόνα 21). Πρόκειται για έναν άνδρα, 78 ετών, ο οποίος εμφάνισε τα πρώτα του συμπτώματα στην ηλικία των 30 ετών. Η βασική κλινική εικόνα των διαγνωστικών κριτηρίων Curacao είναι αυτόματες υποτροπιάζουσες ρινορραγίες, βλεννογονικές αγγειεκτασίες, δερματικές αγγειεκτασίες στα δάκτυλα και στο πρόσωπο και αναιμία. Ο ασθενής παρουσιάζει οικογενειακή σχέση με πάσχοντα επιπλέον μέλη τον πατέρα του, το δίδυμο αδελφό του, δύο αδελφές του που πέθαναν από τη νόσο, το υιό του και τον εγγονό του. Περαιτέρω συνοδά προβλήματα που εμφάνισε είναι δύσπνοια, υπερκινητική κυκλοφορία, καρδιακή ανεπάρκεια και γαστρορραγία.

Η ωτορινολαρυγγική εξέταση έδειξε αγγειοδυσπλασίες στη μύτη ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί αιμοστατικά clips στη γαστρεντερολογική εξέταση. Για αυτό το λόγο δεν κατέστη δυνατό ο απεικονιστικός έλεγχος με MRI/MRA του ασθενούς.

Ο υιός του ατόμου δείκτη, ηλικίας 43 ετών, εμφάνισε τα αρχικά του συμπτώματα σε εφηβική ηλικία και συγκεκριμένα στα 13 του έτη. Εμφανίζει αυτόματες υποτροπιάζουσες ρινορραγίες με συχνότητα 1 ανά 15 μέρες, βλεννογονικές τηλαγγειεκτασίες στοματικής κοιλότητας και δερματικές αγγειεκτασίες δακτύλων. Η ωτορινολαρυγγική εξέταση έδειξε αγγειοδυσπλασίες, ενώ οι απεικονιστικοί έλεγχοι MRI/MRA υπήρξαν χωρίς ευρήματα.



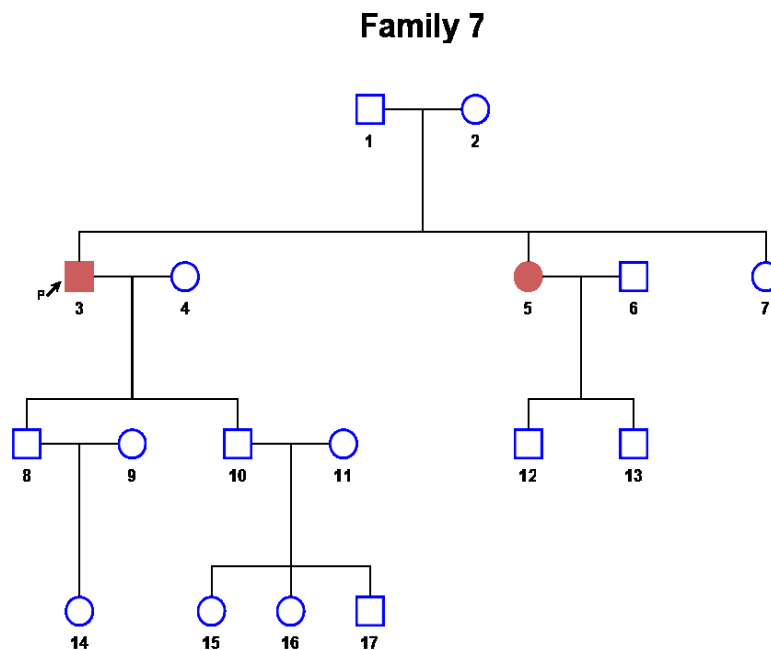
Εικόνα 20: Γενεαλογικό δένδρο της οικογενείας 6. Το άτομο-δείκτης υποδεικνύεται με βέλος.



### Οικογένεια 7:

Στην οικογένεια 13 το άτομο δείκτης είναι άνδρας, ετών 71 της δεύτερης γενεάς του γενεαλογικού δένδρου (Εικόνα 22). Ο ασθενής εμφάνισε τα συμπτώματα στην ηλικία των 45 ετών και παρουσιάζεται με αυτόματες υποτροπιάζουσες ρινορραγίες, βλεννογονικές αγγειεκτασίες και δερματικές αγγειεκτασίες δακτύλων. Επιπλέον υπάρχει οικογενειακό ιστορικό με την αδερφή του να είναι πάσχουσα.

Η κλινική του εικόνα φέρεται να είναι πιο ήπια σε σχέση με άλλους πάσχοντες που μελετήθηκαν καθώς πέρα από ρινικές αιμορραγικές αγγειοδυσπλασίες που ανέδειξε η ωτορινολαρυγγική εξέταση δεν εμφανίζει κάποιο ιδιαίτερο συνοδό σύμπτωμα, καθώς επίσης δεν έχουν διενεργηθεί ακόμα απεικονιστικοί έλεγχοι στο κεφάλι, στους πνεύμονες και στο ήπαρ.



Εικόνα 21: Γενεαλογικό δένδρο της οικογενείας 7. Το άτομο-δείκτης υποδεικνύεται με βέλος.

## 2.2) ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1) Απομόνωση DNA

Απομονώθηκε DNA από εμπύρνα κύτταρα περιφερικού αίματος. Χρησιμοποιήθηκε ολικό αίμα σε EDTA. Η εξαγωγή νουκλεϊκών οξέων έγινε με την μέθοδο φαινόλη/χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη και το kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Λεπτομερέστερα ακολουθήθηκαν τα κάτωθι στάδια:

1. Από 2ml ολικού αίματος ελήφθη το buffy coat μετά από φυγοκέντρηση σε 2000g. Γίνεται λύση κυττάρων με Ultra Pure Water, και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για 2 λεπτά. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε την διαδικασία τουλάχιστο 3 φορές, έως ότου το υπερκείμενο γίνει διαυγές.
2. Στη συνέχεια προσθέτουμε 40μl Proteinase K, προσθέτουμε 400μl λυτικό buffer, αναδεύουμε στο vortex για 15sec και επωάζουμε για 10-20 λεπτά στους 56<sup>0</sup>C.
3. Μετά από βραχεία φυγοκέντρηση (short spin), προσθέτουμε διπλάσια ποσότητα (1200μl) φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη και αναδεύουμε δια αντιστροφής αρκετές φορές.
4. Φυγοκεντριούμε στις 13000rpm για 20' και παίρνουμε την υδατική φάση, όπου βρίσκεται το DNA. Προσθέτουμε 2ml παγωμένη αιθανόλη 100%, οπότε το DNA μετουσιώνεται και το συλλέγουμε με γυάλινο ραβδί. Το διαλύουμε σε 200μl TE buffer.

### 2.2.2) Φωτομετρικός προσδιορισμός DNA

Τα DNA αμέσως μετά ποσοτικοποιήθηκαν μέσω φασματοφωτομετρίας. Τα διαλύματα DNA φωτομετρήθηκαν στα 260nm και στα 280nm για να βρεθούν οι τιμές οπτικής τους πυκνότητας OD<sub>260</sub> και OD<sub>280</sub> αντίστοιχα. Ο λόγος OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> μας δίνει την καθαρότητα του διαλύματος DNA, ο οποίος για απολύτως καθαρά δείγματα είναι 1.8. Η τιμή της οπτικής πυκνότητας OD στα 260nm μας βοηθάει στην ποσοτικοποίηση του DNA στο διάλυμα μέσω της παρακάτω αντιστοιχίας:

$$\text{❖ } 1 \text{ OD στα } 260 \text{ nm για dsDNA} = 50\text{ng/ul dsDNA (ds = double-stranded)}$$

### 2.2.3) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η PCR αποτελεί μια *in vitro* ενζυμική μέθοδο σύνθεσης και πολλαπλασιασμού αλληλουχιών DNA. Για να πραγματοποιηθεί μία τυπική αντίδραση PCR για κάποια αλληλουχία DNA, είναι απαραίτητα: το ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στο οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση, μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια καθώς και δύο εκκινητές (primers). Μία αντίδραση PCR αποτελείται από μία σειρά κύκλων, καθέναν από τους οποίους περιλαμβάνει αποδιάταξη του DNA (denaturation), σύνδεση των εκκινητών με το DNA στόχο (annealing), και επιμήκυνση αλληλουχιών έναρξης από την DNA πολυμεράση (extension). Κάθε κύκλος θεωρητικά διπλασιάζει το προϊόν της αντίδρασης. Μετά από 35 κύκλους το προϊόν της αντίδρασης έχει πολλαπλασιαστεί  $2^{35}$  φορές.

Ακολούθησε πολλαπλασιασμός των εξονίων γονιδίου *ACVRL1* με την μέθοδο της PCR. Το γονίδιο αποτελείται από 10 εξόνια, από τα οποία στα εξόνια 2-10 έχουν εντοπιστεί έως τώρα οι μεταλλάξεις. Για την διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκαν περιβάλλοντες εκκινητές (flanking primers) για το κάθε εξόνιο, που έχει σχεδιαστεί στο εργαστήριό μας με βάση τις αλληλουχίες των γονιδίων *ACVRL1*, που έχουν καταχωρηθεί στην GenBank (*ACVRL1* – OMIM: 232295; 187300; GenBank: AH006911.1, BC014271.2).

Σε κάθε αντίδραση της PCR συμπεριλήφθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας ο οποίος ήταν νερό αντί του αντίστοιχου όγκου DNA, για να εξεταστεί η περίπτωση επιμόλυνσης του διαλύματος της αντίδρασης PCR του αγνώστου δείγματος υπό εξέταση με DNA άλλου οργανισμού.

Οι συνθήκες και τα διαλύματα για την εκτέλεση των πειραμάτων των PCR για τα εξόνια 2-9 πραγματοποιήθηκαν με βάση τον παρακάτω πίνακα:

Exon no	Forward primer	Reverse primer	Nested forward primer	Nested reverse primer	PCR condition	PCR mix	PCR product size (bp)
2	5'-ctc-tgt-gat-ttc-ctc-tgg-gca-3'	5'-tac-att-ctc-ccc-agc-ttc-tca-a-3'	5'-ggc-tct-tac-tcc-acc-tct-ctt-g-3'	5'-cca-ggt-tcc-tgt-ttc-cta-act-gc-3'	D 94°C 30sec A 48°C 30sec E 70°C 35sec	10X Buffer 1X Mg <sup>2+</sup> 2.5mM dNTPs 0.5mM Primers 0.5μM Taq pol 1U	138
3	5'-gac-aga-aat-ggg-tgt-cgg-gct-cag-3'	5'-ggc-caa-gaa-gat-ggg-gag-gga-gtg-3'			D 94°C 30sec A 55°C 30sec E 70°C 40sec	10X Buffer 1X Mg <sup>2+</sup> 3mM dNTPs 0.5mM Primers 0.5μM Taq pol 1U	368
4	5'-agc-tga-cct-agt-gga-agc-tga-3'	5'-ctg-att-ctg-cag-ttc-cta-tct-g-3'	5'-acc-tag-tgg-aag-ctg-agc-ctc-ag-3'	5'-ctg-att-ctg-cag-ttc-cta-tct-gcc-3'	D 94°C 30sec A 50°C 30sec E 68°C 45sec	10X Buffer 1X Mg <sup>2+</sup> 2.5mM dNTPs 0.5mM Primers 0.5μM Taq pol 1U	313
5	5'-ctg-tgg-ctg-gtt-gtg-gca-gcc-tct-3'	5'-cat-gag-agc-cct-tgg-tcc-tca-tcc-3'			D 94°C 30sec A 56°C 30sec E 70°C 30sec	10X Buffer 1X Mg <sup>2+</sup> 2.5mM dNTPs 0.5mM Primers 0.5μM Taq pol 1U	193
6	5'-gct-ctg-tgt-gcc-cag-tgt-gta-a-3'	5'-ctg-gag-gtc-tgc-aaa-ctt-gag-c-3'			D 94°C 30sec A 52°C 30sec E 70°C 40sec	10X Buffer 1X Mg <sup>2+</sup> 3mM dNTPs 0.5mM Primers 0.5μM Taq pol 1U	270
7	5'-ccc-ctt-gct-gag-tca-ccc-aac-ctt-3'	5'-aca-agc-tcc-gcc-cac-ctg-tga-ag-3'			D 94°C 30sec A 56°C 30sec E 70°C 35sec	10X Buffer 1X Mg <sup>2+</sup> 3mM dNTPs 0.5mM Primers 0.5μM Taq pol 1U	361
8	5'-tct-gtc-cca-ctg-ttt-ctc-tca-gtc-3'	5'-aaa-agg-tca-ctc-agc-tga-acc-agc-3'			D 94°C 30sec A 52°C 30sec E 70°C 55sec	10X Buffer 1X Mg <sup>2+</sup> 2.5mM dNTPs 0.5mM Primers 0.5μM Taq pol 1U	450
9	5'-ata-gag-ggt-aga-aaa-ggc-tct-cct-c-3'	5'-atg-aag-cag-agg-cct-cag-aca-ca-3'			D 94°C 30sec A 56°C 30sec E 70°C 45sec	10X Buffer 1X Mg <sup>2+</sup> 2.5mM dNTPs 0.5mM Primers 0.5μM Taq pol 1U	311
10	5'-tct-cct-ctg-cac-ctc-tct-ccc-aa-3'	5'-ctg-cag-gca-gaa-agg-aat-cag-gtg-ct-3'			D 94°C 30sec A 54°C 30sec E 70°C 35sec	10X Buffer 1X Mg <sup>2+</sup> 1.5mM dNTPs 0.5mM Primers 0.5μM Taq pol 1U	197

**Πίνακας 5:** Στον παραπάνω πίνακα αναλύονται οι εκκινητές, οι συνθήκες και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση των PCR για κάθε εξόνιο. Η τελευταία στήλη αναγράφει το τελικό μέγεθος σε bp των τμημάτων DNA που προέκυψαν μετά από τις PCR. (D=denaturation, A=annealing, E=extension).

#### **2.2.4) Ηλεκτροφόρηση:**

Για την ανάλυση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%..

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων, την διαμόρφωση των μορίων στο χώρο (υπερελικωμένα, κυκλικά, γραμμικά) τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα και την εφαρμοζόμενη τάση του ηλεκτρικού πεδίου. Στην ηλεκτροφόρηση το DNA εξαναγκάζεται να μεταναστεύσει μέσα σε πήκτωμα αγαρόζης ως αποτέλεσμα της εφαρμογής τάσης ενός ηλεκτρικού φορτίου. Σε ένα διάλυμα, οι φωσφορικές ομάδες του DNA είναι αρνητικά φορτισμένες και εξαιτίας τους το μόριο θα μετακινηθεί προς το θετικό πόλο. Τα μεγαλύτερα τμήματα του DNA θα μετακινηθούν πιο αργά από ότι τα μικρότερα τμήματα. Η σχέση του μεγέθους των τμημάτων DNA και του ρυθμού μετακίνησης στο πήκτωμα είναι γραμμική, σχέση, που δεν ισχύει για τα πολύ μεγάλα τμήματα DNA. Η μήτρα του πηκτώματος μπορεί να προσαρμοστεί, αυξάνοντας ή μειώνοντας τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Τα πηκτώματα αγαρόζης 2% ετοιμάζονται με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Σε 200ml 1X TBE ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε 4g αγαρόζης σε μια κωνική φιάλη 600ml.
2. Αναδεύουμε για να αιωρηθεί η αγαρόζη.
3. Θερμαίνουμε τη φιάλη σε ένα φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως η αγαρόζη (2,5-5 λεπτά).
4. Στροβιλίζουμε το διάλυμα μέχρι να βεβαιωθούμε, ότι διαλύθηκε πλήρως η αγαρόζη. Αν χρειαστεί θερμαίνουμε και πάλι τη φιάλη για μερικά λεπτά.
5. Αφού έχει διαλυθεί η αγαρόζη μεταγγίζουμε το υλικό στις κατάλληλες μήτρες με προσοχή ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Απομακρύνουμε τυχόν φυσαλίδες με προσοχή.
6. Τοποθετούμε διαφράγματα στο διάλυμα αγαρόζης, τα οποία φέρουν εγκοπές σε σταθερές αποστάσεις διαφόρων διαστάσεων. Όταν το διάλυμα στερεοποιηθεί αφαιρούμε τα διαφράγματα με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν οπές στην γέλη, που θα χρησιμοποιηθούν για την τοποθέτηση των δειγμάτων.

7. Διαλύουμε 1μg δείγματος DNA σε χρωστική 10X loading dye. Τοποθετούμε το πήκτωμα αγαρόζης στην συσκευή υποβρύχιας ηλεκτροφόρησης και εγχύουμε τα δείγματα στις οπές της γέλης που δημιουργήσαμε ανωτέρω.

### **2.2.5) Καθαρισμός προϊόντων PCR**

Ο καθαρισμός των προϊόντων από τις PCR έγινε με το kit PCR purelink purification (Invitrogen) με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Αναμιγνύουμε το προϊόν της PCR με το PureLink Binding Buffer (διάλυμα πρόσδεσης), που περιέχει ισοπροπανόλη, σε αναλογία όγκων 1:4 και το αναδεύουμε έντονα στο vortex.
2. Μεταφέρουμε το διάλυμα σε μια στήλη PureLink Spin που τοποθετείται σε ένα σωληνάριο συλλογής.
3. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 10000g για 1 λεπτό. Το δίκλωνο DNA προσδένεται στη στήλη.
4. Πλένουμε τη στήλη με 650μl Wash Buffer (διάλυμα πλύσης) που περιέχει αιθανόλη.
5. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 10000g για 1 λεπτό.
6. Επαναλαμβάνουμε τη φυγοκέντρωση στα 13400g για 2-3 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν κατάλοιπα από το Wash Buffer (διάλυμα πλύσης).
7. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο έκλουσης 1,7ml και προσθέτουμε 50μl από το Elution Buffer (διάλυμα έκλουσης).
8. Επωάζουμε τη στήλη σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
9. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στα 13400g για 2 λεπτά. Το σωληνάριο έκλουσης περιέχει το καθαρισμένο προϊόν της PCR.

### **2.2.6) Αλληλούχιση:**

Για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA εφαρμόστηκε η ενζυμική μέθοδος των Sanger et al (1977).

Τα δείγματά μας αποστάληκαν στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας της LARK στο Εδιμβούργο και στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας της CEMIA στη Λάρισα και αναλύθηκαν με κατάλληλους εκκινητές. Τα αποτελέσματα επεστράφησαν με τη μορφή χρωματογραφημάτων.

Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων (sequencing) αναλύθηκαν με τα λογισμικά προγράμματα Chromas και BioEdit.

### **2.2.7) Πέψεις και ένζυμα περιορισμού**

Για την επιβεβαίωση ή μη της ύπαρξης σημειακών μεταλλάξεων εφαρμόστηκε η μέθοδος της πέψης με ένζυμο περιορισμού των προϊόντων των αντίστοιχων PCR. Για την εύρεση θέσεων δράσης περιοριστικών ενζύμων και για τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα NEBCutter V2.0 της New England Biolabs Inc. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο *MspI*.

Η πέψη πραγματοποιήθηκε στα προϊόντα PCR με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

- Επώαση των προϊόντων στους 37<sup>0</sup>C για 3 ώρες για τη δράση του ενζύμου περιορισμού
- Επώαση στους 80<sup>0</sup>C για 30 λεπτά ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο περιορισμού.

Το διάλυμα για την εκτέλεση της πέψης ετοιμάστηκε ως εξής:

- Buffer 1X
- 100U ένζυμο περιορισμού.
- 1μg PCR προϊόν σε τελικό όγκο 50 μl.

Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5% για 4 ώρες.

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

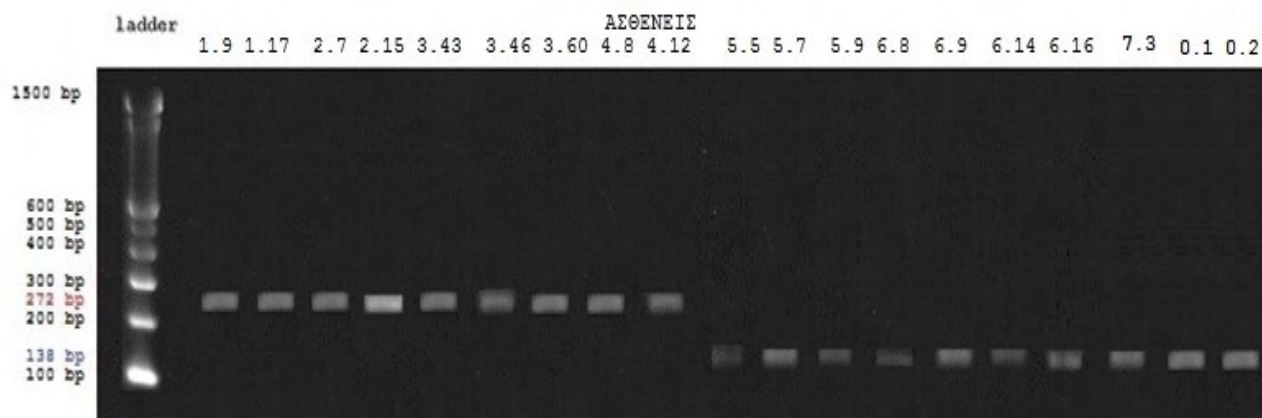


### 3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1) Πηκτώματα αγαρόζης 2% των εξονίων 2-10

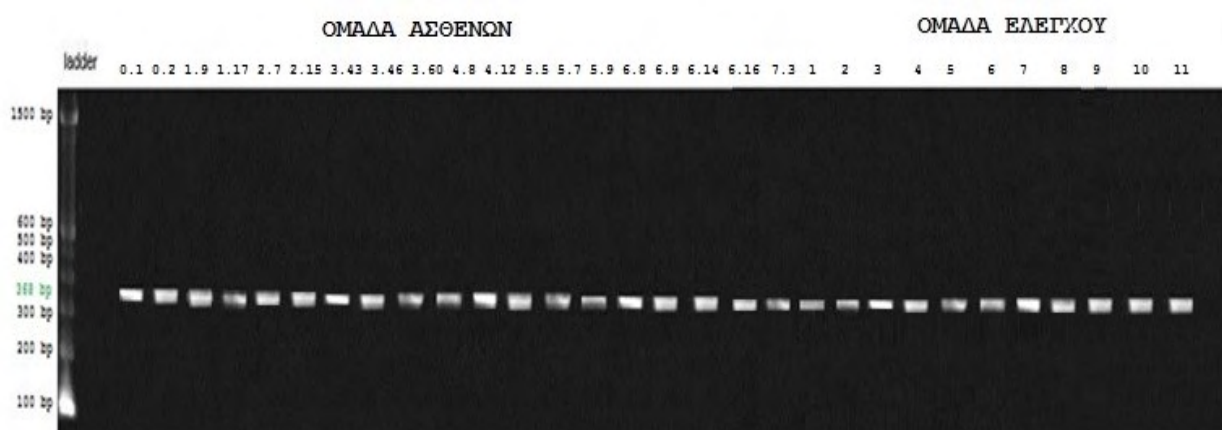
Έγινε PCR στα εξόνια 2-10 σε 100 υγιείς και 19 ασθενείς. Τα προϊόντα PCR που ελήφθησαν με τις αναφερθείσες συνθήκες φαίνονται στις εικόνες 1-10.

##### 1. Εξόνιο 2



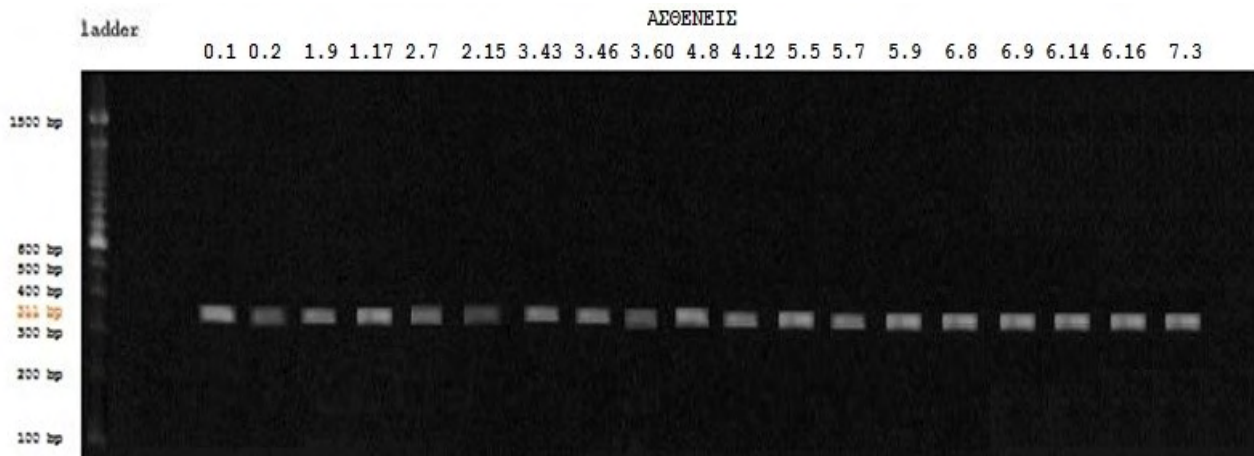
Εικόνα 22: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του αρχικού προϊόντος είναι 272bp και μετά την nested PCR, 138bp. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelpilot 100bp plus. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-21 περιλήφθηκαν τα πάσχοντα μέλη 0.1, 0.2, 1.9, 1.17, 2.7, 2.15, 3.43, 3.46, 3.60, 4.8, 4.12, 5.5, 5.7, 5.9, 6.8, 6.9, 6.14, 6.16 και 7.3.

##### 2. Εξόνιο 3



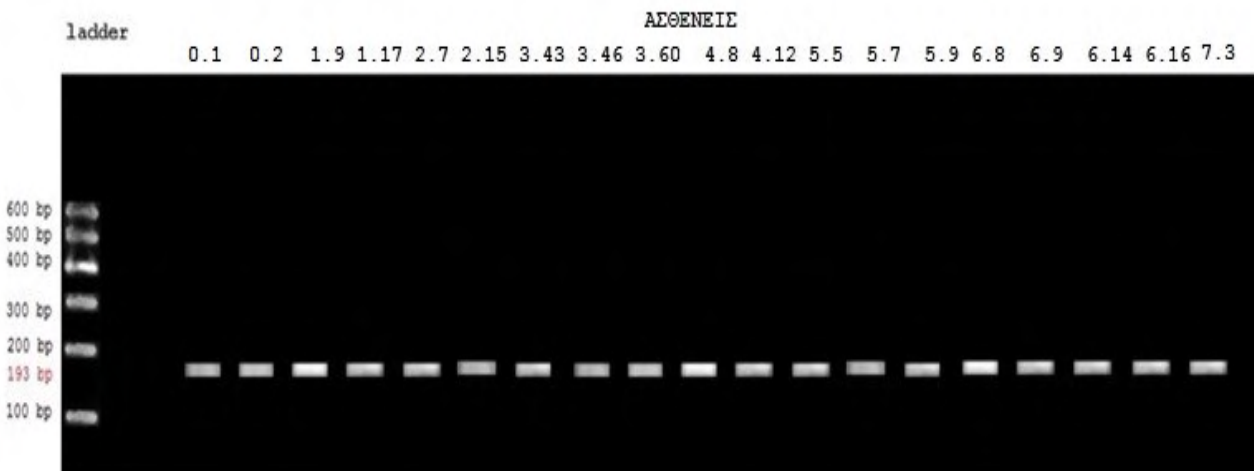
Εικόνα 23: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 368bp. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelpilot 100bp plus. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-21 περιλήφθηκαν τα πάσχοντα μέλη 0.1, 0.2, 1.9, 1.17, 2.7, 2.15, 3.43, 3.46, 3.60, 4.8, 4.12, 5.5, 5.7, 5.9, 6.8, 6.9, 6.14, 6.16 και 7.3. Στις γραμμές 22-32 περιλήφθηκαν υγιή άτομα της ομάδας ελέγχου.

### 3. Εξόνιο 4



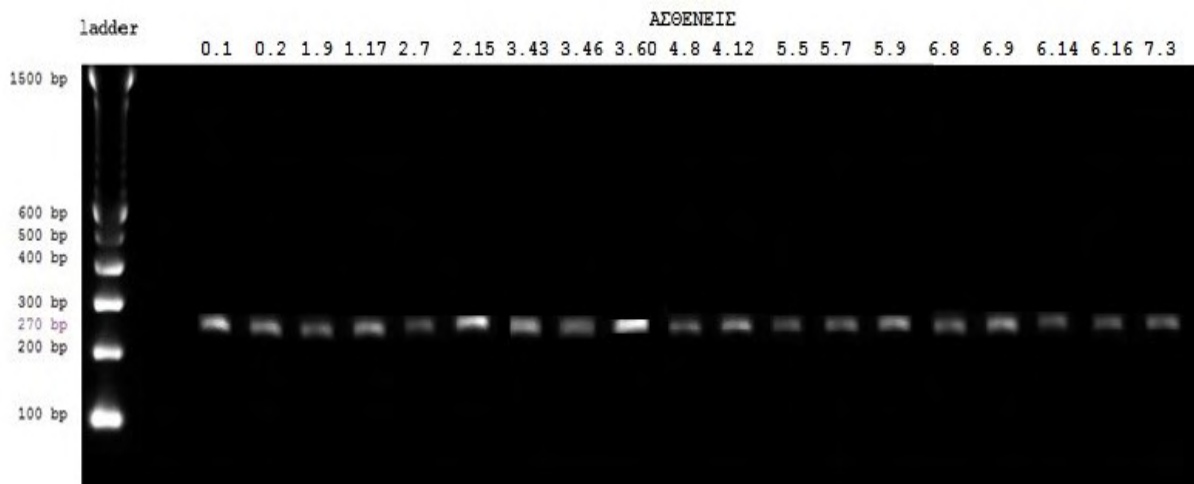
Εικόνα 24: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 3118bp. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelipilot 100bp plus. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-21 περιλήφθηκαν τα πάσχοντα μέλη 0.1, 0.2, 1.9, 1.17, 2.7, 2.15, 3.43, 3.46, 3.60, 4.8, 4.12, 5.5, 5.7, 5.9, 6.8, 6.9, 6.14, 6.16 και 7.3.

### 4. Εξόνιο 5



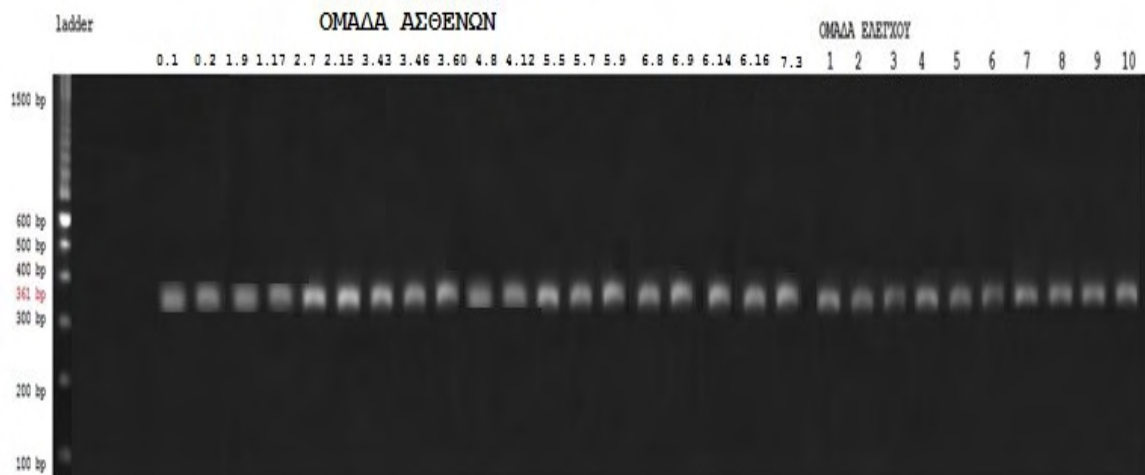
Εικόνα 25: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 193bp. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelipilot 100bp. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-21 περιλήφθηκαν τα πάσχοντα μέλη 0.1, 0.2, 1.9, 1.17, 2.7, 2.15, 3.43, 3.46, 3.60, 4.8, 4.12, 5.5, 5.7, 5.9, 6.8, 6.9, 6.14, 6.16 και 7.3.

## 5. Εξόνιο 6

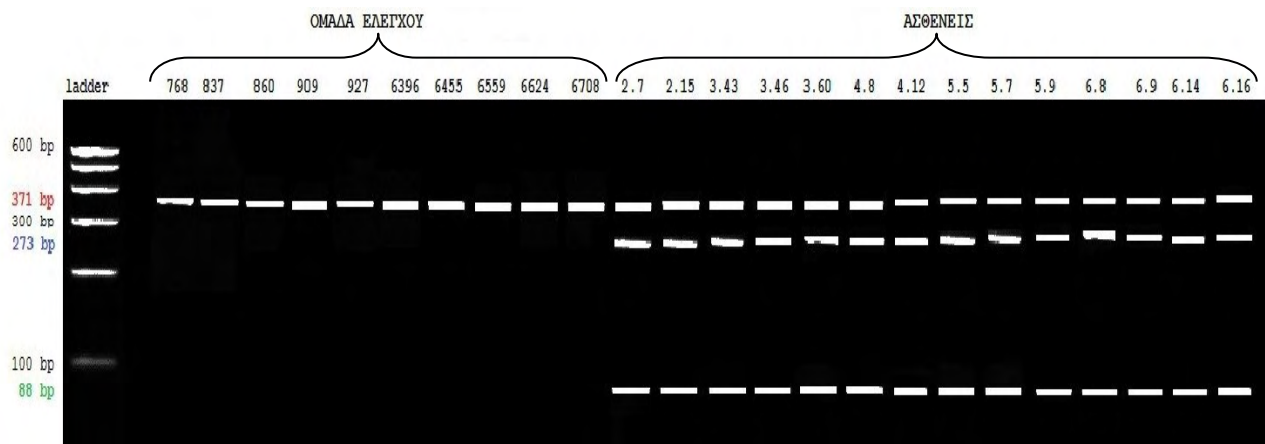


Εικόνα 26: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 270bp. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelipilot 1500bp plus. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-21 περιλήφθηκαν τα πάσχοντα μέλη 0.1, 0.2, 1.9, 1.17, 2.7, 2.15, 3.43, 3.46, 3.60, 4.8, 4.12, 5.5, 5.7, 5.9, 6.8, 6.9, 6.14, 6.16 και 7.3.

## 6. Εξόνιο 7

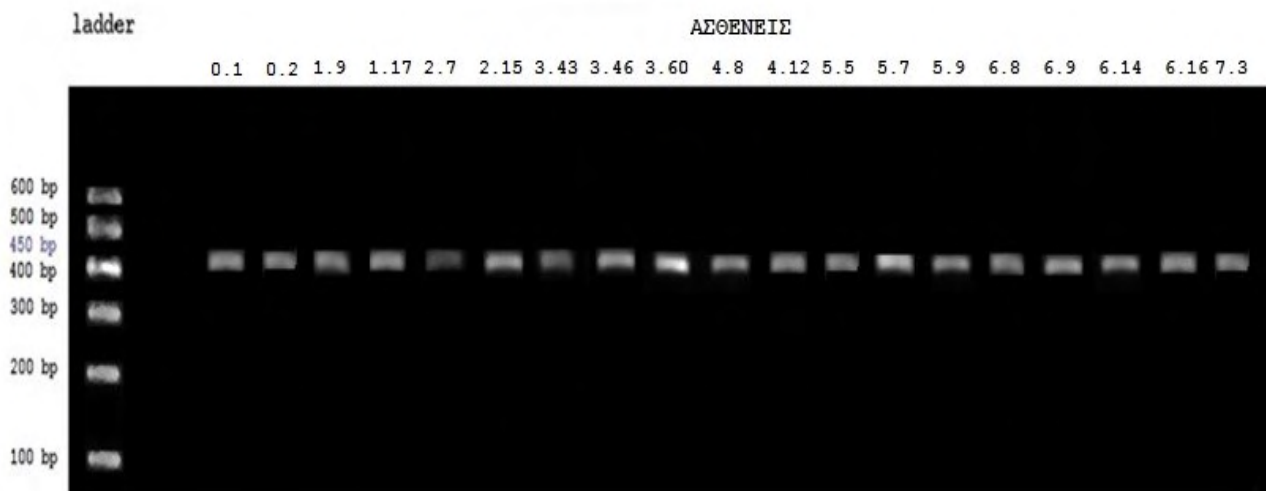


Εικόνα 27: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 361bp. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelipilot 1500bp plus. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-21 περιλήφθηκαν τα πάσχοντα μέλη 0.1, 0.2, 1.9, 1.17, 2.7, 2.15, 3.43, 3.46, 3.60, 4.8, 4.12, 5.5, 5.7, 5.9, 6.8, 6.9, 6.14, 6.16 και 7.3. Στις γραμμές 22-31 περιλήφθηκαν υγιή άτομα της ομάδας ελέγχου.



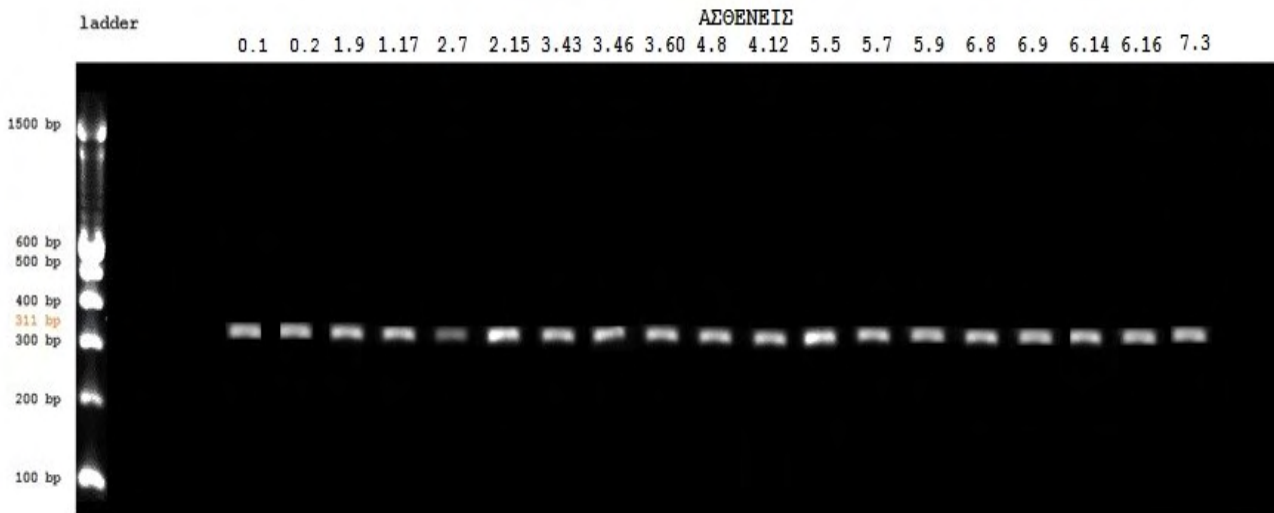
Εικόνα 28: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 3,5% για επιβεβαίωση της σημειακής μετάλλαξης στο εξόνιο 7. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 371bp εφόσον δεν υπάρχει η μετάλλαξη. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelpilot 100bp. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-11 περιλήφθηκαν τα υγιή μέλη της ομάδας ελέγχου τα οποία δε φέρουν τη μετάλλαξη οπότε και εμφανίζουν

## 7. Εξόνιο 8



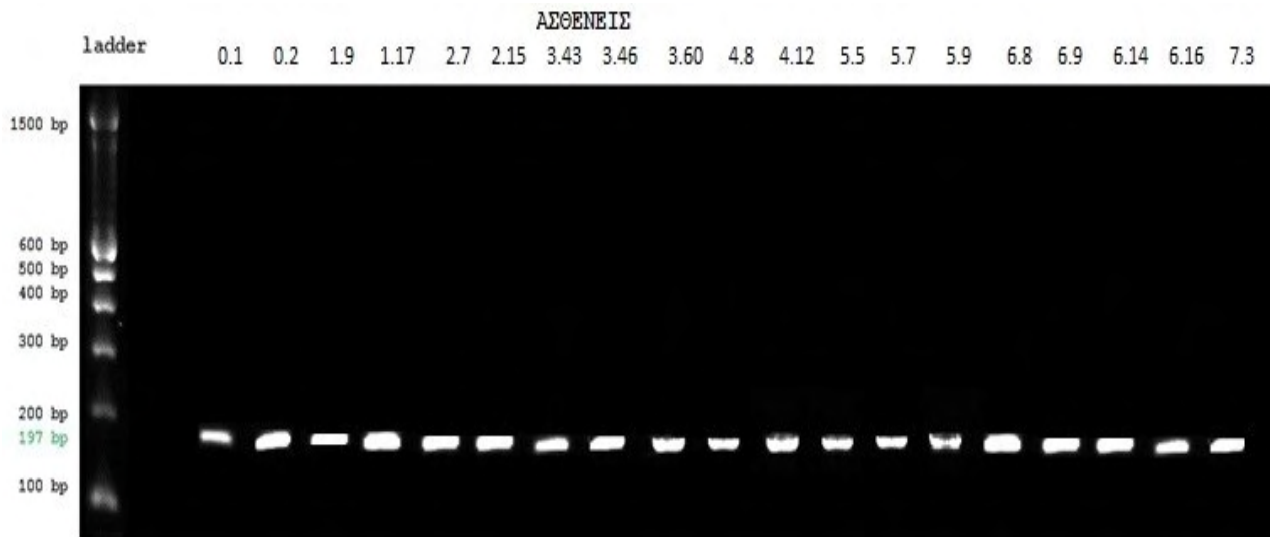
Εικόνα 29: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 450bp. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelpilot 100bp. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-21 περιλήφθηκαν τα πάσχοντα μέλη 0.1, 0.2, 1.9, 1.17, 2.7, 2.15, 3.43, 3.46, 3.60, 4.8, 4.12, 5.5, 5.7, 5.9, 6.8, 6.9, 6.14, 6.16 και 7.3.

## 8. Εξόνιο 9



Εικόνα 30: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 311bp. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelpilot 100bp plus. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-21 περιλήφθηκαν τα πάσχοντα μέλη 0.1, 0.2, 1.9, 1.17, 2.7, 2.15, 3.43, 3.46, 3.60, 4.8, 4.12, 5.5, 5.7, 5.9, 6.8, 6.9, 6.14, 6.16 και 7.3.

## 9. Εξόνιο 10



Εικόνα 31: Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2%. Το μέγεθος του προϊόντος είναι 197bp. Στην γραμμή 1 περιλήφθηκε DNA ladder gelpilot 100bp plus. Στην γραμμή 2 περιλήφθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA template. Στις γραμμές 3-21 περιλήφθηκαν τα πάσχοντα μέλη 0.1, 0.2, 1.9, 1.17, 2.7, 2.15, 3.43, 3.46, 3.60, 4.8, 4.12, 5.5, 5.7, 5.9, 6.8, 6.9, 6.14, 6.16 και 7.3.

### **3.2) Ανάλυση των αλληλουχιών των PCR προϊόντων**

Επειδή δεν υπήρξε καμία αλλαγή στο μέγεθος των προϊόντων μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και πάσχοντων έγινε κατ' ευθείαν ανάλυση αλληλουχίας των εξονίων πρώτα στους πάσχοντες και στην συνέχεια στους υγιείς.

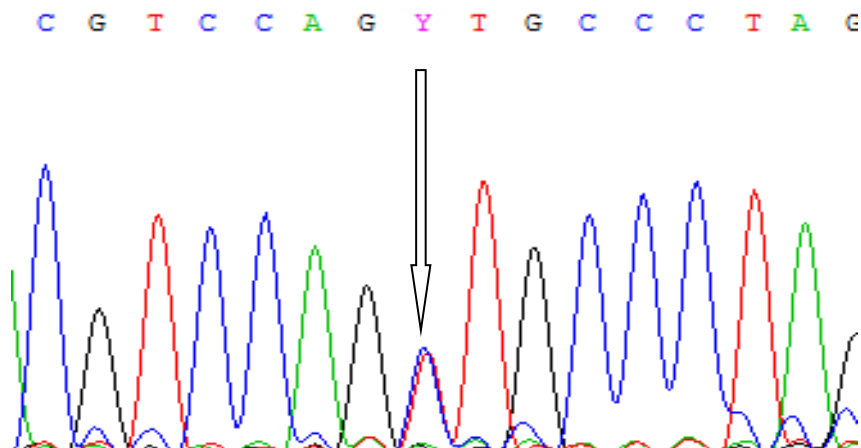
Για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA εφαρμόστηκε η ενζυμική μέθοδος των Sanger et al. Έγινε ανάλυση και των 9 εξονίων, τα οποία μεταφράζονται σε πρωτεΐνη, τόσο στους ασθενείς όσο και σε υγιή άτομα.

#### **3.2.1) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 2 σε ασθενείς με ΗΗΤ**

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του εξονίου 2 στους πάσχοντες που μελετήθηκαν, δεν προέκυψε κάποια μετάλλαξη ή πολυμορφισμός σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς.

#### **3.2.2) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 3 σε ασθενείς με ΗΗΤ**

Από την ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του εξονίου 3, στους πάσχοντες βρέθηκε σε έναν σποραδικό ασθενή (ασθενής 0.1) μία αλλαγή στην θέση 345 (από την θέση έναρξης του εξονίου 3 ( g του gag).



**Εικόνα 32:** Τμήμα της αλληλουχίας του DNA του ασθενούς 0.1, στον οποίο βρέθηκε μια σημειακή αλλαγή βάσης. Η αλλαγή τονίζεται με το σύμβολο Y, στο οποίο, όπως φαίνεται στην εικόνα, υπάρχουν δύο επικαλυπτόμενες κορυφές που αντιστοιχούν στα δύο αλληλόμορφα του ασθενούς. Η αλλαγή βάσης αφορά αντικατάσταση μιας βάσης T από μια βάση C.

Refer. Sequence	GACAGAAATGGGTGTCGGGCTCAGCCTGGGGGAGCTGGGACCACAGTGGCTGAGCTTCCG
Native	GACAGAAATGGGTGTCGGGCTCAGCCTGGGGGAGCTGGGACCACAGTGGCTGAGCTTCCG
Refer. Sequence	GTGTGTCTTCCAGGAGACCCGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTGT
Native	GTGTGTCTTCCAGGAGACCCGTGAAGCCGTCTCGGGGCCCGCTGGTGACCTGCACGTGT
Refer. Sequence	GAGAGCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGCCTGGTGACAGTAGTGTGGTG
Native	GAGAGCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGGGGGCCTGGTGACAGTAGTGTGGTG
Refer. Sequence	CGGGAGGAGGGGAGGCACCCCAAGAACATCGGGGCTGCGGGAACCTGCACAGGGAGCTC
Native	CGGGAGGAGGGGAGGCACCCCAAGAACATCGGGGCTGCGGGAACCTGCACAGGGAGCTC
Refer. Sequence	TGCAGGGGGCGCCCAACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCGACAGCCACCTCTGCAAC
Native	TGCAGGGGGCGCCCAACCGAGTTCGTCAACCACTACTGCTGCGACAGCCACCTCTGCAAC
Refer. Sequence	CACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGGTACGTCCAGTGCCTAGCACTCCCTCCCCATCT
Native	CACAACGTGTCCCTGGTGCTGGAGGGTACGTCCAGTGCCTAGCACTCCCTCCCCATCT
Refer. Sequence	TCTTGCC
Native	TCTTGCC

**Εικόνα 33:** Στην θέση 23 της ιντρονικής αλληλουχίας, η βάση T της αλληλουχίας αναφοράς (Genebank: NM\_00020.2) αντικαταστάθηκε από τη βάση C στην αλληλουχία του ασθενούς. 0.1. Η ομοπαράθεση έγινε μέσω του προγράμματος Blastp του NCBI Blast.

Συγκεκριμένα έγινε αντικατάσταση T με C. Η θέση αυτή αφορά σε θέση ιντρονίου 3 (11 βάσεις μετά το τέλος του εξονίου 3) που είχε περιληφθεί μεταξύ των Flanking primers για την εκτέλεση της PCR. Για την μελέτη συσχέτισμού της μετάλλαξης με την νόσο μελετήθηκαν και τα υγιή μέλη της οικογένειας καθώς και 100 υγιή άτομα του κοινού πληθυσμού της περιοχής. Δεν διαπιστώθηκε παρουσία της αλλαγής αυτής σε υγιή άτομα.

### **3.2.3) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 4 σε ασθενείς με HHT**

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του εξονίου 4 στους πάσχοντες που μελετήθηκαν, δεν προέκυψε κάποια μετάλλαξη ή πολυμορφισμός σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς.

### **3.2.4) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 5 σε ασθενείς με HHT**

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του εξονίου 5 στους πάσχοντες που μελετήθηκαν, δεν προέκυψε κάποια μετάλλαξη ή πολυμορφισμός σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς.

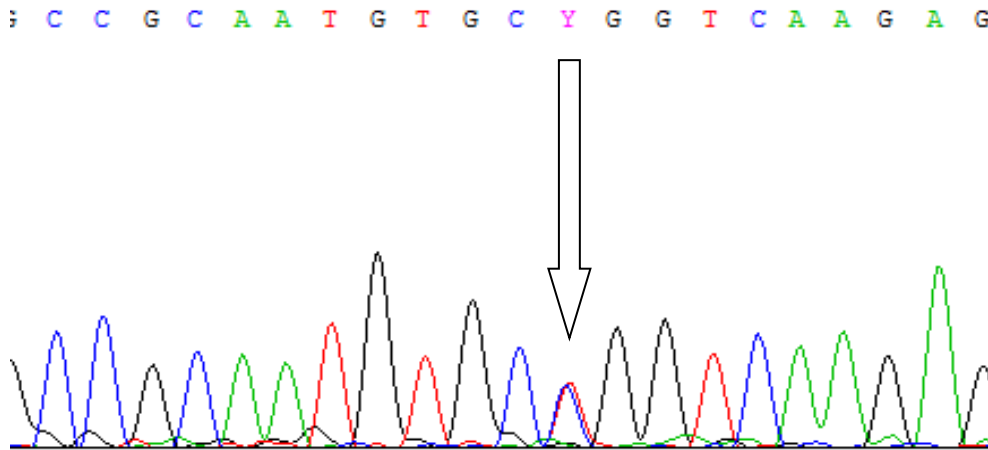
### **3.2.5) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 6 σε ασθενείς με HHT**

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του εξονίου 6 στους πάσχοντες που μελετήθηκαν, δεν προέκυψε κάποια μετάλλαξη ή πολυμορφισμός σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς.

### **3.2.6) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 7 σε ασθενείς με HHT**

Από την ανάλυση των τμημάτων των DNA των ασθενών, που μελετήθηκαν, προέκυψε μια αντικατάσταση T από C, στη θέση 237 από την έναρξη του εξονίου 7 (g του gct) στις οικογένειες 2, 3, 4, 5, 6, η οποία αντιστοιχεί στη θέση 1010 του cDNA.





Εικόνα 34: Τμήμα της αλληλουχίας του DNA των ασθενών, στους οποίους βρέθηκε μια σημειακή αλλαγή βάσης. Η αλλαγή τονίζεται με το σύμβολο Y, στο οποίο, όπως φαίνεται στην εικόνα υπάρχουν δύο επικαλυπτόμενες κορυφές που αντιστοιχούν στα δύο αλληλόμορφα του ασθενούς. Η αλλαγή βάσης αφορά αντικατάσταση μιας βάσης T από μια βάση C.

Η αντικατάσταση αυτή δημιουργεί μια θέση περιορισμού για το ένζυμο *MspI*. Για την επιβεβαίωση της συσχέτισης της μετάλλαξης αυτής με την ύπαρξη της νόσου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε όλα τα πάσχοντα και στα φυσιολογικά άτομα των οικογενειών των πασχόντων ατόμων όσο και σε υγιή άτομα του γενικού πληθυσμού με τη μέθοδο της πέψης ενζύμου των PCR προϊόντων με το ένζυμο *MspI*. Όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν δυο ζώνες στις ηλεκτροφορήσεις των πέψεων, γεγονός που συνεπάγεται την ύπαρξη της μετάλλαξης, ενώ κανένα από τα υγιή άτομα των οικογενειών ή του γενικού πληθυσμού δεν εμφάνισε δυο ζώνες, άρα δεν φέρουν και την αλλαγή αυτή.

Ref Sequence	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
2.7	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
2.15	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
3.43	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
3.46	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
3.60	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
4.8	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
4.12	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
5.5	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
5.7	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
5.9	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
6.8	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
6.9	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
6.14	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60
6.16	1	CCCCTTGCTGAGTCACCCAACCTTTCTGCACACAGGCTTCATCGCCTCAGACATGACCTC	60

Ref Sequence	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
2.7	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
2.15	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
3.43	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
3.46	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
3.60	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
4.8	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
4.12	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
5.5	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
5.7	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
5.9	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
6.8	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
6.9	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
6.14	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120
6.16	61	CCGCAACTCGAGCACGACGCTGTGGCTCATCACGCACTACCACGAGCACGGCTCCCTCTA	120

Ref Sequence	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
2.7	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
2.15	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
3.43	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
3.46	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
3.60	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
4.8	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
4.12	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
5.5	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
5.7	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
5.9	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
6.8	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
6.9	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
6.14	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180
6.16	121	CGACTTCTGCAGAGACAGACGCTGGAGCCCCATCTGGCTCTGAGGCTAGCTGTGTCCGC	180

Ref Sequence	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
2.7	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
2.15	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
3.43	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
3.46	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
3.60	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
4.8	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
4.12	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
5.5	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
5.7	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
5.9	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
6.8	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
6.9	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
6.14	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240
6.16	181	GGCATGCGGCCTGGCGCACTGCACGTGGAGATCTTCGGTACACAGGGCAAACAGCCAT	240

273

Ref Sequence	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
2.7	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
2.15	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
3.43	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
3.46	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
3.60	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
4.8	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
4.12	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
5.5	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
5.7	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
5.9	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
6.8	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
6.9	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
6.14	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300
6.16	241	TGCCCCACCGGACTTCAAGAGCCGCAATGTGCTGGTCAAGAGCAAACCTGCAGTGTTCAT	300



Παρακάτω παρουσιάζεται η αμινοξική αλληλουχία της περιοχής του εξονίου 7, όπως αυτή προκύπτει από τη μετάφραση του mRNA:

NATIVE	1	MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEG	60
REFER PROTEIN	1	MTLGSPRKGLMLLMALVTQGDVPKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEG	60
NATIVE	61	RHPQEHRCGCGNLHRELRCGRPTEFVNHYCCDShLCNHNVSIVLEATQPPSEQPGTDGQLA	120
REFER PROTEIN	61	RHPQEHRCGCGNLHRELRCGRPTEFVNHYCCDShLCNHNVSIVLEATQPPSEQPGTDGQLA	120
NATIVE	121	LILGPVLALLALVALGVLGLWHVRRRQEKQRLHSELGESSLILKASEQGDSMLGDLDS	180
REFER PROTEIN	121	LILGPVLALLALVALGVLGLWHVRRRQEKQRLHSELGESSLILKASEQGDSMLGDLDS	180
NATIVE	181	DCTTSGSGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF	240
REFER PROTEIN	181	DCTTSGSGSGLPFLVQRTVARQVALVECVGKGRYGEVWRGLWHGESVAVKIFSSRDEQSWF	240
NATIVE	241	RETEIYNTVLLRHDNILGFIASDMTSRNSSTQLWLITHYHEHGSlyDFLQRQTILEPHLAL	300
REFER PROTEIN	241	RETEIYNTVLLRHDNILGFIASDMTSRNSSTQLWLITHYHEHGSlyDFLQRQTILEPHLAL	300
NATIVE	301	RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLQCCIAIDLGLAVMHSQGSD	360
REFER PROTEIN	301	RLAVSAACGLAHLHVEIFGTQGKPAIAHRDFKSRNVLVKSNLQCCIAIDLGLAVMHSQGSD	360
NATIVE	361	YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTD CFESYKWTDIWAFGLVLWEIARRTIVNGIVED	420
REFER PROTEIN	361	YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTD CFESYKWTDIWAFGLVLWEIARRTIVNGIVED	420
NATIVE	421	YRPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCDVQQTPTIPNRLAADPVL SGLAQMRECWYPNPSARL	480
REFER PROTEIN	421	YRPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCDVQQTPTIPNRLAADPVL SGLAQMRECWYPNPSARL	480
NATIVE	481	TALRIKKTILQKISNSPEKPKVIQ	503
REFER PROTEIN	481	TALRIKKTILQKISNSPEKPKVIQ	503

**Εικόνα 36:** Ομοπαράθεση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των ασθενών με ΗΗΤ με την πρότυπη αλληλουχία όπως υπάρχει στη βάση δεδομένων GenBank (AAH42637.1). Στη θέση 337 της αλληλουχίας των ασθενών υπάρχει μια αντικατάσταση ενός αμινοξέος λευκίνης (L) από ένα αμινοξύ προλίνης (P).

Από την ομοπαράθεση της φυσιολογικής πρωτεϊνικής αλληλουχίας, όπως αυτή υπάρχει στη βάση δεδομένων (ncbi genbank:AAH42637.1), με την πρωτεϊνική αλληλουχία των ασθενών ατόμων προκύπτει μια αντικατάσταση ενός καταλοίπου αμινοξέος λευκίνης (L), από το αμινοξύ προλίνης (P), στην θέση 337 της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (p337P>L).

### **3.2.7) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 8 σε ασθενείς με HHT**

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του εξονίου 8 στους πάσχοντες που μελετήθηκαν, δεν προέκυψε κάποια μετάλλαξη ή πολυμορφισμός σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς.

### **3.2.8) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 9 σε ασθενείς με HHT**

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του εξονίου 9 στους πάσχοντες που μελετήθηκαν, δεν προέκυψε κάποια μετάλλαξη ή πολυμορφισμός σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς.

### **3.2.9) Ανάλυση της αλληλουχίας DNA του εξονίου 10 σε ασθενείς με HHT**

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του εξονίου 10 στους πάσχοντες που μελετήθηκαν, δεν προέκυψε κάποια μετάλλαξη ή πολυμορφισμός σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειεκτασία είναι μια γενετική διαταραχή, της οποίας η διεισδυτικότητα κυμαίνεται ευρέως. Η διακύμανση της βαρύτητος της νόσου αφορά τόσο την ηλικία εκδήλωσης της νόσου όσο και την βαρύτητα των κλινικών της εκδηλώσεων. Οι διακυμάνσεις αυτές υφίστανται ακόμα και ανάμεσα στα μέλη της ίδιας οικογένειας. Η σοβαρότητα των κλινικών συμπτωμάτων ποικίλει και μπορεί να κυμαίνεται από πολύ ήπια, όπως για παράδειγμα με την εμφάνιση σποραδικών ρινορραγιών, έως πολύ σοβαρή με την εμφάνιση κάποιου AVM στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο, στο ήπαρ ή στη γαστρεντερική οδό. Η έκβαση ορισμένες φορές είναι ακόμα και απειλητική για τη ζωή του ασθενούς, όπως συμβαίνει κυρίως με την παρουσία ενός εγκεφαλικού αποστήματος ή μιας ενδοκρανιακής αιμορραγίας, που όμως μερικές φορές μπορεί να παραμείνουν κλινικά σιωπηλά. Η κατάλληλη θεραπεία μπορεί να αποτρέψει τέτοια απειλητικά, για τη ζωή του ασθενούς, γεγονότα. Κύριες θεραπείες που βρίσκονται σε εφαρμογή είναι η εμβολοθεραπεία, η οποία εφαρμόζεται για τα πνευμονικά και εγκεφαλικά AVM, τόσο σε ενήλικες όσο και σε εφήβους και παιδιά.

Οι ραγδαίες εξελίξεις στον τομέα της μοριακής βιολογίας και της γενετικής έδωσαν την κατάλληλη εργαλειοθήκη για την εύκολη και άμεση προσυμπτωματική διάγνωση της HHT σε άτομα και τις οικογένειες τους. Η δυνατότητα χαρτογράφησης και ανάλυσης του γενετικού υλικού αυτών των ασθενών παρέχει την ικανότητα εύρεσης των υπεύθυνων γονιδίων, καθώς και των μεταλλάξεων τους, που οδηγούν στην εμφάνιση του συνδρόμου. Έως τώρα έχουν βρεθεί 4 γονίδια, υπεύθυνα για τη νόσο, όπως επίσης έχουν συσχετιστεί και επιπλέον 2 γενετικοί τόποι, με μελέτες γενετικής σύνδεσης, χωρίς να έχουν ταυτοποιηθεί τα αντίστοιχα γονίδια. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν οικογένειες που κατάγονται από την περιοχή της Θεσσαλίας και οικογένειες που κατάγονται από την περιοχή της Κρήτης. Στην έρευνα περιλήφθηκε και μια ομάδα ελέγχου υγιών ατόμων. Όλοι οι ασθενείς που μελετήθηκαν είχαν διαγνωσμένη νόσο Osler-Rendu-Weber με τουλάχιστο τρία κλινικά συμπτώματα να είναι παρόντα σύμφωνα με τα Curacao κριτήρια (Πίνακας 1). Επίσης συμπεριλήφθηκαν 2 οικογένειες, των οποίων τα άτομα είναι πιθανόν ασθενείς, καθώς εμφάνισαν μόνο δύο κλινικά συμπτώματα με βάση τα κριτήρια.

Με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων της χαρτογράφησης του γονιδίου *ACVRL1* σε ασθενείς αλλά και σε υγιή άτομα, βρέθηκε μια αντικατάσταση μιας βάσης T από μια βάση C στη θέση 11 του ιντρονίου 3 στο άτομο 1 της οικογένειας 8. Πρόκειται για μια αλλαγή πολύ κοντά στο τέλος του εξονίου 3, η οποία είναι ήδη καταγεγραμμένη στην βάση δεδομένων για την HHT (HHT mutation database, [http://arup.utah.edu/database/ACVRL1/ACVRL1\\_display.php](http://arup.utah.edu/database/ACVRL1/ACVRL1_display.php)). Η αλλαγή αυτή δε θεωρείται ότι επηρεάζει την συρραφή του εξονίου 3 και κατά συνέπεια δε θεωρείται μετάλλαξη, που σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου. Παρόλα αυτά, η εμφάνιση της αλλαγής αυτής δε βρέθηκε στην ομάδα ελέγχου των υγιών ατόμων ούτε στα υγιή άτομα της οικογένειας. Επί αυτού, θα πρέπει να γίνει βαθύτερη μελέτη σε επίπεδο έκφρασης, ώστε να διαπιστωθεί τυχόν επιρροή της αλλαγής στη διαδικασία της συρραφής των εξονίων κατά την ωρίμανση του mRNA και τυχόν αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης.

Από την ανάλυση της χαρτογράφησης της αλληλουχίας του DNA των ασθενών με νόσο ORW, αλλά και των υγιών ατόμων, προέκυψε μια σημειακή αλλαγή βάσης στο εξόνιο 7 των οικογενειών 2, 3, 4, 5, 6. Από τη σύγκριση των αλληλουχιών των ασθενών με την αλληλουχία αναφοράς, όπως αυτή δημοσιεύεται στην GenBank, η σημειακή αλλαγή αφορά την αντικατάσταση μιας βάσης T από μια βάση C, στη θέση 237 του εξονίου 7. Η συγκριτική ανάλυση της μετάφρασης της φυσιολογικής αλληλουχίας με την αλληλουχία των ασθενών προκύπτει μια αλλαγή αμινοξέος στη θέση 337 της αμινοξικής αλληλουχίας. Η αλλαγή αυτή είναι μια αντικατάσταση ενός αμινοξέος λευκίνης (L), το οποίο είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ, από ένα αμινοξύ προλίνης (P), το οποίο είναι επίσης ένα υδρόφοβο αμινοξύ. Αυτή η αλλαγή έχει περιγραφεί επίσης και από τους *Lesca et al* (2004)[150], και έως τώρα δεν έχει αποσαφηνιστεί αν είναι μια παθογόνα μετάλλαξη ή όχι. Παρόλο που και τα δύο αμινοξέα είναι υδρόφοβα, η προλίνη περιέχει στη δομή της μια πλευρική δευτεροταγή αμίνη. Η προλίνη είναι ένα μοναδικό αμινοξύ, ανάμεσα στα 20 αμινοξέα που συμμετέχουν στη δημιουργία πρωτεϊνών, καθώς είναι το μόνο αμινοξύ που περιέχει δευτεροταγή αμίνη στη δομή της, δηλαδή το άζωτο της αμινοξικής ομάδας συνδέεται με δύο αλκυλομάδες ( $R_1-N(H)-R_2$ ). Η προλίνη είναι από τα σημαντικότερα αμινοξέα, όσον αφορά τον καθορισμό της δομής των πρωτεϊνικών αλυσίδων, λόγω της δομικής ιδιαιτερότητας που προσδίδει στο μόριο ο πενταμελής δακτύλιος[158,159]. Οπότε είναι πολύ πιθανό αυτή η αλλαγή να τροποποιεί την



τριδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την μεταβολή της λειτουργίας της. Επιπλέον, η μετάλλαξη αυτή, έχει βρεθεί μόνο σε ασθενείς των συγκεκριμένων οικογενειών και όχι σε υγιή άτομα των ίδιων των οικογενειών ή του πληθυσμού ελέγχου, γεγονός που ενισχύει την πιθανότητα παθογονικής μεταβολής της πρωτεΐνης σε άτομα που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Η ύπαρξη της ίδιας μετάλλαξης σε άτομα διαφορετικών οικογενειών μας οδηγεί, επίσης, στην πιθανότητα της ύπαρξης του φαινομένου του ιδρυτή (founder effect). Η καταγωγή των οικογενειών αυτών προέρχεται από την περιοχή της Θεσσαλίας και είναι πάρα πολύ πιθανό οι οικογένειες αυτές να προέρχονται από ένα κοινό πρόγονο που τους μεταβίβασε την συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Από την ανάλυση της αλληλουχίας του DNA των οικογενειών 1, 7, καθώς και του δεύτερου σποραδικού ατόμου δεν προέκυψε καμία μετάλλαξη ή πολυμορφισμός στα εξόνια ή τις ιντρονικές περιοχές του γονιδίου *ACVRL1*. Η διαγνωσμένη ύπαρξη της HHT, λόγω της κλινικής συμπτωματολογίας των ατόμων αυτών των οικογενειών, σε συνδυασμό με την απώλεια μεταλλάξεων στο γονίδιο *ACVRL1*, καθώς και στο γονίδιο *ENG*, οδηγεί στην υπόνοια ύπαρξης μεταλλάξεων σε ένα από τα υπόλοιπα γονίδια, που είναι υπεύθυνα για την δημιουργία της HHT.

# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Sutton HG, Epistaxis as an indication of impaired nutrition and of degeneration of the vascular system. *Med Mirror* 1864; 769-81.
2. Hirschberg R. What Benjamin Babington, William Osler, Frederick Weber, and Henri Rendu did not know. *Cardiovasc Res.* 2005 Nov 1;68(2):180-2
3. Kjeldsen AD, Vase P, Green A. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Med.* 1999 Jan;245(1):31-90.
4. Plauchu H, de Chidarevuan JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of HHT in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 1989; 32:291-97.
5. Dakeishi M, Shioya T, Wada Y, Shindo T, Otaka K, Manabe M, Nozaki J, Inoue S, Koizumi A. Genetic epidemiology of hereditary hemorrhagic telangiectasia in a local community in the northern part of Japan. *Hum Mutat.* 2002 Feb;19(2):140-8.
6. Porteous ME, Burn J, Proctor SJ. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical analysis. *J Med Genet.* 1992 Aug;29(8):527-30.
7. McDonald J, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Haematologica.* 2005 Jun;90(6):728-32.
8. Braverman IM, Keh A, Jacobson BS. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol.* 1990 Oct;95(4):422-7.
9. Govani FS, Shovlin CL. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet.* 2009 Jul;17(7):860-71.
10. Fiorella ML, Ross D, Henderson KJ, White RI Jr. Outcome of septal dermoplasty in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope.* 2005 Feb;115(2):301-5.
11. Sabbà C, Gallitelli M, Pasculli G, Suppressa P, Resta F, Tafaro GE. HHT: A rare spectrum of clinical aspects. *Curr Pharm Des.* 2006;12(10):1217-20.
12. Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 1995 Oct 5;333(14):918-24.
13. Brady AP, Murphy MM, O'Connor TM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a cause of preventable morbidity and mortality. *Ir J Med Sci.* 2009 Jun;178(2):135-46.
14. Saluja S, Henderson KJ, White RI Jr. Embolotherapy in the bronchial and pulmonary circulations. *Radiol Clin North Am.* 2000 Mar;38(2):425-48.
15. Nanthakumar K, Graham AT, Robinson TI, Grande P, Pugash RA, Clarke JA, Hutchison SJ, Mandzia JL, Hyland RH, Faughnan ME. Contrast echocardiography for detection of pulmonary arteriovenous malformations. *Am Heart J.* 2001 Feb;141(2):243-6.
16. Faughnan ME, Thabet A, Mei-Zahav M, Colombo M, Maclusky I, Hyland RH, Pugash RA, Chait P, Henderson KJ, White RI Jr. Pulmonary arteriovenous malformation in children: transcatheter embolotherapy. *J Pediatr.* 2004 Dec;145(6):826-31.

17. Faughnan ME, Lui YW, Wirth JA, Pugash RA, Redelmeier DA, Hyland RH, White RI Jr. Diffuse pulmonary arteriovenous malformations: characteristics and prognosis. *Chest*. 2000 Jan;117(1):31-8.
18. Tal MG, Saluja S, Henderson KJ, White RI Jr. Vein of Galen technique for occluding the aneurysmal sac of pulmonary arteriovenous malformations. *J Vasc Interv Radiol*. 2002 Dec;13(12):1261-4.
19. Thenganatt J, Schneiderman J, Hyland RH, Edmeads J, Mandzia JL, Faughnan ME. Migraines linked to intrapulmonary right-to-left shunt. *Headache*. 2006 Mar;46(3):439-43.
20. White RI Jr, Pollak JS, Wirth JA. Pulmonary arteriovenous malformations: diagnosis and transcatheter embolotherapy. *J Vasc Interv Radiol*. 1996 Nov-Dec;7(6):787-804.
21. Longacre AV, Gross CP, Gallitelli M, Henderson KJ, White RI Jr, Proctor DD. Diagnosis and management of gastrointestinal tract in patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Gastroenterol*. 2003 Jan;98(1):59-65.
22. Jaskolka J, Wu L, Chan RP, Faughnan ME. Imaging of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *AJR Am J Roentgenol*. 2004 Aug;183(2):307-14.
23. Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL. Hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome): a view from 21st century. *Postgrad Med J*. 2003 Jan;79(927):18-24.
24. Siddiki H, Doherty MG, Fletcher JG, Stanson AW, Vrtiska TJ, Hough DM, Fidler JL, McCollough CH, Swanson KL. Abdominal findings in hereditary hemorrhagic telangiectasia: pictorial essay on 2D and 3D findings with isotropic multiphase CT. *Radiographics*. 2008 Jan-Feb;28(1):171-84.
25. Sell B, Evans J, Horn D. *South Med J*. Brain abscess and hereditary hemorrhagic telangiectasia. 2008 Jun;101(6):618-25.
26. Memeo M, Scardapane A, De Blasi R, Sabbà C, Carella A, Angelelli G. Diagnostic imaging in the study of visceral involvement of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Radiol Med*. 2008 Jun;113(4):547-66.
27. Matsubara S, Mandzia JL, ter Brugge K, Willinsky RA, Faughnan ME. Angiographic and clinical characteristics of patients with cerebral arteriovenous malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000 Jun-Jul;21(6):1016-20.
28. Fulbright RK, Chaloupka JC, Putman CM, Sze GK, Merriam MM, Lee GK, Fayad PB, Awad IA, White RI Jr. MR of hereditary hemorrhagic telangiectasia: prevalence and spectrum of cerebrovascular malformations. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1998 Mar;19(3):477-84.
29. Krings T, Ozanne A, Chng SM, Alvarez H, Rodesch G, Lasjaunias PL. Neurovascular phenotypes in hereditary haemorrhagic telangiectasia patients according to age. Review of 50 consecutive patients aged 1 day-60 years. *Neuroradiology*. 2005 Oct;47(10):711-20.
30. Maher CO, Piepgras DG, Brown RD Jr, Friedman JA, Pollock BE. Cerebrovascular manifestations in 321 cases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Stroke*. 2001 Apr;32(4):877-82.

31. Mathisen GE, Johnson JP. Brain abscess. *Clin Infect Dis*. 1997 Oct;25(4):763-79.
32. Selby R, Ramirez CB, Singh R, Kleopoulos I, Kusne S, Starzl TE, Fung J. Brain abscess in solid organ transplant recipients receiving cyclosporine-based immunosuppression. *Arch Surg*. 1997 Mar;132(3):304-10.
33. Calfee DP, Wispelwey B. Brain abscess. *Semin Neurol*. 2000;20(3):353-60.
34. Ogino M, Inoue H, Harada S, Horinouchi H, Nakamura T. Cerebellar abscess associated with pulmonary arteriovenous fistula and hereditary hemorrhagic telangiectasia--case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1996 Aug;36(8):575-9.
35. Barlas O, Sencer A, Erkan K, Eraksoy H, Sencer S, Bayindir C. Stereotactic surgery in the management of brain abscess. *Surg Neurol*. 1999 Oct;52(4):404-10.
36. Garcia-Tsao G. Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *J Hepatol*. 2007 Mar;46(3):499-507.
37. Wanless IR, Gryfe A. Nodular transformation of the liver in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Pathol Lab Med*. 1986 Apr;110(4):331-5.
38. Sawabe M, Arai T, Esaki Y, Tsuru M, Fukazawa T, Takubo K. Three-dimensional organization of the hepatic microvasculature in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Pathol Lab Med*. 2001 Sep;125(9):1219-23.
39. Ianora AA, Memeo M, Sabba C, Cirulli A, Rotondo A, Angelelli G. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: multi-detector row helical CT assessment of hepatic involvement. *Radiology*. 2004 Jan;230(1):250-9.
40. Memeo M, Stabile Ianora AA, Scardapane A, Buonamico P, Sabbà C, Angelelli G. Hepatic involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia: CT findings. *Abdom Imaging*. 2004 Mar-Apr;29(2):211-20.
41. Garcia-Tsao G, Korzenik JR, Young L, Henderson KJ, Jain D, Byrd B, Pollak JS, White RI Jr. Liver disease in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*. 2000 Sep 28;343(13):931-6.
42. Fagel WJ, Perlberger R, Kauffmann RH. Portosystemic encephalopathy in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Med*. 1988 Dec;85(6):858-60.
43. Naganuma H, Ishida H, Niizawa M, Igarashi K, Shioya T, Masamune O. Hepatic involvement in Osler-Weber-Rendu disease: findings on pulsed and color Doppler sonography. *AJR Am J Roentgenol*. 1995 Dec;165(6):1421-5.
44. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*. 2002 Mar;35(3):716-21.
45. Baba Y, Ohkubo K, Hamada K, Hokotate H, Nakajo M. Hyperintense basal ganglia lesions on T1-weighted images in hereditary hemorrhagic telangiectasia with hepatic involvement. *J Comput Assist Tomogr*. 1998 Nov-Dec;22(6):976-9.
46. Kobayashi Z, Tani Y, Watabiki S, Himeno Y, Ishiai S. Brain MRI of hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) with intrahepatic arteriovenous shunts. *Intern Med*. 2005 Jul;44(7):773-4.

47. Buscarini E, Danesino C, Olivieri C, Lupinacci G, De Grazia F, Reduzzi L, Blotta P, Gazzaniga P, Pagella F, Grosso M, Pongiglione G, Buscarini L, Plauchu H, Zambelli A. Doppler ultrasonographic grading of hepatic vascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia -- results of extensive screening. *Ultraschall Med.* 2004 Sep;25(5):348-55.
48. Caselitz M, Bahr MJ, Bleck JS, Chavan A, Manns MP, Wagner S, Gebel M. Sonographic criteria for the diagnosis of hepatic involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *Hepatology.* 2003 May;37(5):1139-46.
49. Wu JS, Saluja S, Garcia-Tsao G, Chong A, Henderson KJ, White RI Jr. Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia: CT and clinical findings do not correlate in symptomatic patients. *AJR Am J Roentgenol.* 2006 Oct;187(4):W399-405.
50. Ravard G, Soyer P, Boudiaf M, Terem C, Abitbol M, Yeh JF, Brouard R, Hamzi L, Rymer R. Hepatic involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia: helical computed tomography features in 24 consecutive patients. *J Comput Assist Tomogr.* 2004 Jul-Aug;28(4):488-95.
51. Milot L, Gautier G, Beuf O, Pilleul F. Hereditary hemorrhagic telangiectases: magnetic resonance imaging features in liver involvement. *J Comput Assist Tomogr.* 2006 May-Jun;30(3):405-11.
52. Matsumoto S, Mori H, Yamada Y, Hayashida T, Hori Y, Kiyosue H. Intrahepatic porto-hepatic venous shunts in Rendu-Osler-Weber disease: imaging demonstration. *Eur Radiol.* 2004 Apr;14(4):592-6.
53. Plauchu H, de Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet.* 1989 Mar;32(3):291-7.
54. Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, Kjeldsen AD, Plauchu H. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet.* 2000 Mar 6;91(1):66-7.
55. Stuhmann M, El-Harith el-HA. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. Genetics, pathogenesis, clinical manifestation and management. *Saudi Med J.* 2007 Jan;28(1):11-21.
56. Shovlin CL, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. *Thorax.* 1999 Aug;54(8):714-29.
57. Cil B, Canyigit M, Ozkan OS, Pamuk GA, Dogan R. Bilateral multiple pulmonary arteriovenous malformations: endovascular treatment with the Amplatzer Vascular Plug. *J Vasc Interv Radiol.* 2006 Jan;17(1):141-5.
58. White RI Jr. Re: Bilateral multiple pulmonary arteriovenous malformations: endovascular treatment with the Amplatzer vascular plug. *J Vasc Interv Radiol.* 2006 May;17(5):913-5.
59. Sagara K, Miyazono N, Inoue H, Ueno K, Nishida H, Nakajo M. Recanalization after coil embolotherapy of pulmonary arteriovenous

- malformations: study of long-term outcome and mechanism for recanalization. *AJR Am J Roentgenol.* 1998 Mar;170(3):727-30.
60. White RI Jr. Recanalization after embolotherapy of pulmonary arteriovenous malformations: significance? Outcome? *AJR Am J Roentgenol.* 1998 Dec;171(6):1704-5.
  61. Buscarini E, Plauchu H, Garcia Tsao G, White RI Jr, Sabbà C, Miller F, Saurin JC, Pelage JP, Lesca G, Marion MJ, Perna A, Faughnan ME. Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia: consensus recommendations. *Liver Int.* 2006 Nov;26(9):1040-6.
  62. Sadick H, Sadick M, Götte K, Naim R, Riedel F, Bran G, Hörmann K. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on clinical manifestations and diagnostic measures. *Wien Klin Wochenschr.* 2006 Mar;118(3-4):72-80.
  63. Sharathkumar AA<sup>1</sup>, Shapiro A. Hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Haemophilia.* 2008 Nov;14(6):1269-80
  64. Abdalla SA, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet.* 2006 Feb;43(2):97-110.
  65. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Nov;8(11):857-69.
  66. Bobik A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Aug;26(8):1712-20.
  67. Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development.* 2009 Nov;136(22):3699-714.
  68. Harradine KA, Akhurst RJ. Mutations of TGFbeta signaling molecules in human disease. *Ann Med.* 2006;38(6):403-14.
  69. Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem.* 2005 Mar 4;280(9):7409-12.
  70. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res.* 2005 Feb 15;65(3):599-608.
  71. Lin HY, Moustakas A. TGF-beta receptors: structure and function. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1994 May;40(3):337-49.
  72. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest.* 2005 Dec;128(6 Suppl):585S-590S.
  73. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003 Oct 9;425(6958):577-84.
  74. van den Driesche S, Mummery CL, Westermann CJ. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor beta signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2003 Apr 1;58(1):20-31.
  75. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005 Dec 1;19(23):2783-810.
  76. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Apr;19(2):176-84.

77. Goto K, Kamiya Y, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K. Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem.* 2007 Jul 13;282(28):20603-11.
78. Mochizuki T, Miyazaki H, Hara T, Furuya T, Imamura T, Watabe T, Miyazono K. Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling. *J Biol Chem.* 2004 Jul 23;279(30):31568-74.
79. Wrighton KH, Lin X, Feng XH. Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 8;105(27):9244-9.
80. Kowanzetz M, Lönn P, Vanlandewijck M, Kowanzetz K, Heldin CH, Moustakas A. TGFbeta induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling. *J Cell Biol.* 2008 Aug 25;182(4):655-62.
81. Goumans MJ, Mummery C. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol.* 2000 Apr;44(3):253-65.
82. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 2002 Apr 2;21(7):1743-53.
83. McDonald J, Damjanovich K, Millson A, Wooderchak W, Chibuk JM, Stevenson DA, Gedge F, Bayrak-Toydemir P. Molecular diagnosis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: findings in a series tested simultaneously by sequencing and deletion/duplication analysis. *Clin Genet.* 2011 Apr;79(4):335-44
84. Fernández-L A, Sanz-Rodriguez F, Blanco FJ, Bernabéu C, Botella LM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res.* 2006 Mar;4(1):66-78.
85. McDonald MT, Papenberg KA, Ghosh S, Glatfelter AA, Biesecker BB, Helmbold EA, Markel DS, Zolotor A, McKinnon WC, Vanderstoep JL, et al. A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q33-34. *Nat Genet.* 1994 Feb;6(2):197-204.
86. Shovlin CL, Hughes JM, Tuddenham EG, Temperley I, Perembelon YF, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. A gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q3. *Nat Genet.* 1994 Feb;6(2):205-9.
87. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet.* 1994 Dec;8(4):345-51.
88. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Gutmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet.* 1996 Jun;13(2):189-95.
89. Wallace GM, Shovlin CL. A hereditary haemorrhagic telangiectasia family with pulmonary involvement is unlinked to the known HHT genes, endoglin and ALK-1. *Thorax.* 2000 Aug;55(8):685-90.



90. Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL. A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet.* 2005 Jul;42(7):577-82.
91. Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderon F, Tuncali T, Tang W, Miller F, Mao R. A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A.* 2006 Oct 15;140(20):2155-62.
92. Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, Mitchell G, Drouin E, Westermann CJ, Marchuk DA. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet.* 2004 Mar 13;363(9412):852-9.
93. Rigelsky CM, Jennings C, Lehtonen R, Minai OA, Eng C, Aldred MA. BMPR2 mutation in a patient with pulmonary arterial hypertension and suspected hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Med Genet A.* 2008 Oct 1;146A(19):2551-6.
94. Jirillo E, Amati L, Suppressa P, Cirimele D, Guastamacchia E, Covelli V, Tafaro E, Sabbà C. Involvement of the transforming growth factor beta in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Curr Pharm Des.* 2006;12(10):1195-200.
95. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- $\beta$  receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med.* 2003 Oct;13(7):301-7.
96. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997 Mar;8(1):21-43.
97. Kjeldsen AD, Møller TR, Brusgaard K, Vase P, Andersen PE. Clinical symptoms according to genotype amongst patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Intern Med.* 2005 Oct;258(4):349-55.
98. Letteboer TG, Mager JJ, Snijder RJ, Koeleman BP, Lindhout D, Ploos van Amstel JK, Westermann CJ. Genotype-phenotype relationship in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet.* 2006 Apr;43(4):371-7.
99. Bossler AD, Richards J, George C, Godmilow L, Ganguly A. Novel mutations in ENG and ACVRL1 identified in a series of 200 individuals undergoing clinical genetic testing for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): correlation of genotype with phenotype. *Hum Mutat.* 2006 Jul;27(7):667-75.
100. Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Markewitz B, Lewin S, Miller F, Chou LS, Gedge F, Tang W, Coon H, Mao R. Genotype-phenotype correlation in hereditary hemorrhagic telangiectasia: mutations and manifestations. *Am J Med Genet A.* 2006 Mar 1;140(5):463-70.
101. Sabbà C, Pasculli G, Lenato GM, Suppressa P, Lastella P, Memeo M, Dicuonzo F, Guant G. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: clinical features in ENG and ALK1 mutation carriers. *J Thromb Haemost.* 2007 Jun;5(6):1149-57.
102. Lesca G, Olivieri C, Burnichon N, Pagella F, Carette MF, Gilbert-Dussardier B, Goizet C, Roume J, Rabilloud M, Saurin JC, Cottin V, Honnorat J, Coulet F, Giraud S, Calender A, Danesino C, Buscarini E, Plauchu H; French-Italian-

- Rendu-Osler Network. Genotype-phenotype correlations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: data from the French-Italian HHT network. *Genet Med.* 2007 Jan;9(1):14-22.
103. Lacout A, Pelage JP, Lesur G, Chinet T, Beauchet A, Roume J, Lacombe P. Pancreatic involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia: assessment with multidetector helical CT. *Radiology.* 2010 Feb;254(2):479-84.
  104. Letteboer TG, Mager HJ, Snijder RJ, Lindhout D, Ploos van Amstel HK, Zanen P, Westermann KJ. Genotype-phenotype relationship for localization and age distribution of telangiectases in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Med Genet A.* 2008 Nov 1;146A(21):2733-9.
  105. Bernabeu C, Conley BA, Vary CP. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem.* 2007 Dec 15;102(6):1375-88.
  106. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004 Oct 13;23(20):4018-28.
  107. Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol.* 2007 Jan 19;365(3):694-705.
  108. Lebrin F, Mummery CL. Endoglin-mediated vascular remodeling: mechanisms underlying hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends Cardiovasc Med.* 2008 Jan;18(1):25-32.
  109. Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet.* 1997 Jul;61(1):68-79.
  110. Paquet ME, Pece-Barbara N, Vera S, Cymerman U, Karabegovic A, Shovlin C, Letarte M. Analysis of several endoglin mutants reveals no endogenous mature or secreted protein capable of interfering with normal endoglin function. *Hum Mol Genet.* 2001 Jun 15;10(13):1347-57.
  111. Pece N, Vera S, Cymerman U, White RI Jr, Wrana JL, Letarte M. Mutant endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 is transiently expressed intracellularly and is not a dominant negative. *J Clin Invest.* 1997 Nov 15;100(10):2568-79.
  112. Piantanida M, Buscarini E, Dellavecchia C, Minelli A, Rossi A, Buscarini L, Danesino C. Hereditary haemorrhagic telangiectasia with extensive liver involvement is not caused by either HHT1 or HHT2. *J Med Genet.* 1996 Jun;33(6):441-3.
  113. Govani FS, Shovlin CL. Fine mapping of the hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT)3 locus on chromosome 5 excludes VE-Cadherin-2, Sprouty4 and other interval genes. *J Angiogenes Res.* 2010 Aug 11;2:15.
  114. Wooderchak-Donahue, W. L., McDonald, J., O'Fallon, B., Upton, P. D., Li, W., Roman, B. L., Young, S., Plant, P., Fulop, G. T., Langa, C., Morrell, N. W., Botella, L. M., Bernabeu, C., Stevenson, D. A., Runo, J. R., Bayrak-Toydemir, P. BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic

- overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am. J. Hum. Genet.* 93: 530-537, 2013.
115. Johnson DW, Berg JN, Gallione CJ, McAllister KA, Warner JP, Helmbold EA, Markel DS, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA. A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome Res.* 1995 Aug;5(1):21-8.
  116. Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA. The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet.* 1997 Jul;61(1):60-7.
  117. Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis FM, Massagué J, Wrana JL. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell.* 1993 Nov 19;75(4):671-80.
  118. ten Dijke P, Ichijo H, Franzén P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene.* 1993 Oct;8(10):2879-87.
  119. Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Fernandez-L A, Langa C, Vary CP, Lee UE, Friedman SL, Botella LM, Bernabeu C. Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Mol Biol.* 2010 Jun 29;11:51.
  120. Botella LM, Sánchez-Elsner T, Rius C, Corbí A, Bernabéu C. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem.* 2001 Sep 14;276(37):34486-94
  121. Wasylyk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A. Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci.* 1998 Jun;23(6):213-6.
  122. Cao YX, Jean JC, Williams MC. Cytosine methylation of an Sp1 site contributes to organ-specific and cell-specific regulation of expression of the lung epithelial gene t1alpha. *Biochem J.* 2000 Sep 15;350 Pt 3:883-90.
  123. Abdalla SA, Cymerman U, Johnson RM, Deber CM, Letarte M. Disease-associated mutations in conserved residues of ALK-1 kinase domain. *Eur J Hum Genet.* 2003 Apr;11(4):279-87.
  124. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2626-31.
  125. Lux A, Salway F, Dressman HK, Kröner-Lux G, Hafner M, Day PJ, Marchuk DA, Garland J. ALK1 signalling analysis identifies angiogenesis related genes and reveals disparity between TGF-beta and constitutively active receptor induced gene expression. *BMC Cardiovasc Disord.* 2006 Apr 4;6:13.

126. Seki T, Yun J, Oh SP. Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res*. 2003 Oct 3;93(7):682-9.
127. Urness LD, Sorensen LK, Li DY. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*. 2000 Nov;26(3):328-31.
128. Lux A, Attisano L, Marchuk DA. Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):9984-92.
129. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1953-61.
130. Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS. Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet*. 2003 Apr 1;12 Spec No 1:R97-112.
131. Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2002 Dec;193(3):299-318.
132. Seki T, Hong KH, Oh SP. Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest*. 2006 Feb;86(2):116-29.
133. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell*. 2003 Oct;12(4):817-28.
134. Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, Bailly S. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4495-501.
135. Abdalla SA, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, Letarte M. Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet*. 2000 May 1;9(8):1227-37.
136. Sanz-Rodriguez F, Fernandez-L A, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Ramirez JR, Coto E, Bernabeu C, Botella LM. Mutation analysis in Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: deficient endoglin up-regulation in activated monocytes. *Clin Chem*. 2004 Nov;50(11):2003-11.
137. Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Morales C, Restrepo CM, Ramirez JR, Coto E, Lenato GM, Bernabeu C, Botella LM. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and expression analysis of Endoglin and ALK1. *Hum Mutat*. 2006 Mar;27(3):295.
138. Fontalba A, Fernandez-L A, García-Alegria E, Albiñana V, Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Bernabeu-Herrero ME, Ojeda ML, Fernandez-Luna JL, Bernabeu C, Botella LM. Mutation study of Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *BMC Med Genet*. 2008 Aug 1;9:75.

139. Schulte C, Geisthoff U, Lux A, Kupka S, Zenner HP, Blin N, Pfister M. High frequency of ENG and ALK1/ACVRL1 mutations in German HHT patients. *Hum Mutat.* 2005 Jun;25(6):595.
140. Kuehl HK, Caselitz M, Hasenkamp S, Wagner S, El-Harith el-HA, Manns MP, Stuhmann M. Hepatic manifestation is associated with ALK1 in hereditary hemorrhagic telangiectasia: identification of five novel ALK1 and one novel ENG mutations. *Hum Mutat.* 2005 Mar;25(3):320.
141. Wehner LE, Folz BJ, Argyriou L, Twelkemeyer S, Teske U, Geisthoff UW, Werner JA, Engel W, Nayernia K. Mutation analysis in hereditary haemorrhagic telangiectasia in Germany reveals 11 novel ENG and 12 novel ACVRL1/ALK1 mutations. *Clin Genet.* 2006 Mar;69(3):239-45.
142. Sadick H, Hage J, Goessler U, Stern-Straeter J, Riedel F, Hoermann K, Bugert P. Mutation analysis of "Endoglin" and "Activin receptor-like kinase" genes in German patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and the value of rapid genotyping using an allele-specific PCR-technique. *BMC Med Genet.* 2009 Jun 9;10:53.
143. Shoukier M, Teske U, Weise A, Engel W, Argyriou L. Characterization of five novel large deletions causing hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet.* 2008 Apr;73(4):320-30.
144. El-Harith el-HA, Kühnau W, Schmidtke J, Gadzicki D, Ahmed M, Krawczak M, Stuhmann M. Hereditary hemorrhagic telangiectasia is caused by the Q490X mutation of the ACVRL1 gene in a large Arab family: support of homozygous lethality. *Eur J Med Genet.* 2006 Jul-Aug;49(4):323-30.
145. Kjeldsen AD, Brusgaard K, Poulsen L, Kruse T, Rasmussen K, Green A, Vase P. Mutations in the ALK-1 gene and the phenotype of hereditary hemorrhagic telangiectasia in two large Danish families. *Am J Med Genet.* 2001 Feb 1;98(4):298-302.
146. Brusgaard K, Kjeldsen AD, Poulsen L, Moss H, Vase P, Rasmussen K, Kruse TA, Hørder M. Mutations in endoglin and in activin receptor-like kinase 1 among Danish patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clin Genet.* 2004 Dec;66(6):556-61.
147. Letteboer TG, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, Lindhout D, Hennekam FA, Westermann CJ, Ploos van Amstel JK. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet.* 2005 Jan;116(1-2):8-16.
148. Lenato GM, Lastella P, Di Giacomo MC, Resta N, Suppressa P, Pasculli G, Sabbà C, Guanti G. DHPLC-based mutation analysis of ENG and ALK-1 genes in HHT Italian population. *Hum Mutat.* 2006 Feb;27(2):213-4.
149. Olivieri C, Pagella F, Semino L, Lanzarini L, Valacca C, Pilotto A, Corno S, Scappaticci S, Manfredi G, Buscarini E, Danesino C. Analysis of ENG and ACVRL1 genes in 137 HHT Italian families identifies 76 different mutations (24 novel). Comparison with other European studies. *J Hum Genet.* 2007;52(10):820-9.

150. Lesca G, Plauchu H, Coulet F, Lefebvre S, Plessis G, Odent S, Rivière S, Leheup B, Goizet C, Carette MF, Cordier JF, Pinson S, Soubrier F, Calender A, Giraud S; French Rendu-Osler Network. Molecular screening of ALK1/ACVRL1 and ENG genes in hereditary hemorrhagic telangiectasia in France. *Hum Mutat.* 2004 Apr;23(4):289-99.
151. Lesca G, Burnichon N, Raux G, Tosi M, Pinson S, Marion MJ, Babin E, Gilbert-Dussardier B, Rivière S, Goizet C, Faivre L, Plauchu H, Frébourg T, Calender A, Giraud S; French Rendu-Osler Network. Distribution of ENG and ACVRL1 (ALK1) mutations in French HHT patients. *Hum Mutat.* 2006 Jun;27(6):598.
152. Abdalla SA, Cymerman U, Rushlow D, Chen N, Stoeber GP, Lemire EG, Letarte M. Novel mutations and polymorphisms in genes causing hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mutat.* 2005 Mar;25(3):320-1.
153. Assis AM, Costa FF, Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Bertuzzo CS. Three novel mutations in the activin receptor-like kinase 1 (ALK-1) gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2 in Brazilian patients. *J Hum Genet.* 2007;52(3):237-43.
154. Zhang GS, Yi Y, Peng HL, Shen JK, Xie DH, He XB. Clinical phenotypes, ALK1 gene mutation and level of related plasma proteins in Chinese hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Chin Med J (Engl).* 2004 Jun;117(6):808-12.
155. Zhang GS, Peng HL, Yi Y, Xie DH, He XB. [Mutation of the activin receptor-like kinase 1(ALK1) gene and the expression of plasma thrombomodulin in type-2 hereditary hemorrhagic telangiectasia: a study of a Chinese family]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2004 Feb 2;84(3):182-5.
156. Xie GL, Li ZX, Li ZX. [Hereditary hemorrhagic telangiectasia caused by mutation in intron 4 of ALK1 gene: analysis of a HHT family]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2007 Jan 23;87(4):249-52.
157. Lee ST, Kim JA, Jang SY, Kim DK, Do YS, Suh GY, Kim JW, Ki CS. Clinical features and mutations in the ENG, ACVRL1, and SMAD4 genes in Korean patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Korean Med Sci.* 2009 Feb;24(1):69-76.
158. Pavlov, Michael Y; Watts, Richard E; Tan, Zhongping; Cornish, Virginia W; Ehrenberg, Måns; Forster, Anthony C (2010), "Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation", *PNAS* 106 (1): 50–54.
159. Buskirk, Allen R.; Green, Rachel (2013). "Getting Past Polyproline Pauses". *Science* 339 (6115): 38–39.