



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ p.A119S ΤΗΣ
ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΗΣ-1 ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ
ΑΓΝΩΣΤΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**FREQUENCY OF THE ANGIOPOIETIN-1 PATHOGENIC VARIANT p.A119S IN
PATIENTS WITH UNKNOWN HEREDITARY ANGIOEDEMA**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΛΑΠΑΤΖΗ ΙΩΑΝΝΑ- ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Λάρισα, 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΡΜΕΝΗΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ, ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Δρ. Αναστάσιος Ε. Γερμενής (επιβλέπων)
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά
Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Δρ. Γιακουντής Αντώνιος
Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια της spin-off εταιρείας του Εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας -CeMIASA- υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Αναστασίου Ε. Γερμενή. Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γερμενή για τη βοήθεια, τη στήριξη και την καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα. Για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν ως μέλη της επιτροπής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές κ. Άννα-Μαρία Ψαρρά και τον κ. Γιακουντή Αντώνιο.

Ευχαριστώ την υπεύθυνη σχεδιασμού και ανάπτυξης της CeMIASA Μαρία Ζαμανάκου και τον υπεύθυνο εργαστηρίου Γεδεών Λουλέ για την καθοδήγησή τους καθώς ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου δουλειάς. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την διδακτορική φοιτήτρια Σοφία Βάτσιου για τις πολύτιμες συμβουλές της, όπως επίσης και για την άψογη συνεργασία και την ευχάριστη ατμόσφαιρα καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

HAE	Κληρονομικό αγγειοίδημα
U-HAE	Κληρονομικό αγγειοίδημα αγνώστου αιτιολογίας
AAE	Επίκτητο αγγειοίδημα
ANGPT-1	Αγγειοποιητίνη
PLG	Πλασμινογόνο
ACE	Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης
ACEi	Αναστολέας του μετατρεπτικού ενζύμου
VEGF	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
EPC	Ενδοθηλιακό προγονικό κύτταρο
HK	Υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο
Plasmakallikrein, PK	Καλλικρεΐνη πλάσματος
B1 receptor, B1R	Υποδοχέας B1
B2 receptor, B2R	Υποδοχέας B2
C1 inhibitor, C1-INH	Αναστολέας της C1 εστεράσης
FXII, FactorHageman	Παράγοντας XII

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
2. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ ΑΓΝΩΣΤΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	9
2.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ U-ΗΑΕ	9
2.2 ΕΠΙΠΤΩΣΗ	11
2.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	11
4. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ANGPT-1.....	17
5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ANGPT-1 ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΒΡΑΔΥΚΙΝΙΝΗΣ.....	20
6. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ U-ΗΑΕ	21
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	22
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ	22
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	27
2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΔΙΚΟΥ	27
2.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ 2 ΜΕΣΩ PCR.....	27
2.2.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	28
2.2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR	28
2.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	31
2.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ.....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	40

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κληρονομικό αγγειοοίδημα (HAE) είναι ένα σπάνιο γενετικό νόσημα, όπου το 80-85% των περιπτώσεων προκύπτει από ανεπάρκεια του C1-INH [46] και από ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο FXII. Ωστόσο, σε μια σειρά ασθενών με HAE δεν έχει περιγραφεί η αιτιολογική γενετική βλάβη και η παθοφυσιολογία της νόσου παραμένει άγνωστη (U-HAE). Η αναγνώριση των γονιδίων που εμπλέκονται στην παθολογία του U-HAE είναι πολύτιμη για την διάγνωση και την κατανόηση της νόσου. Ένα τέτοιου είδους γονίδιο είναι αυτό της *ANGPT-1*, καθώς εμπλέκεται στο μονοπάτι της βραδυκινίνης, προσφέροντας έναν πιθανό μηχανισμό εμφάνισης του U-HAE.

Πρόσφατα, έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ιταλικό πληθυσμό ανέδειξε ως παθογονική για την εκδήλωση HAE σε μία οικογένεια την μετάλλαξη p.A199S στο γονίδιο της *ANGPT-1*. Η μετάλλαξη θα μπορούσε να εμπλέκεται στην εμφάνιση του U-HAE μέσω μείωσης των επιπέδων της *ANGPT-1* και άρα αύξησης της συγκέντρωσης της βραδυκινίνης στο πλάσμα.

Με βάση τα ευρήματα αυτά, πραγματοποιήσαμε έλεγχο της μετάλλαξης *ANGPT-1* p.A199S σε 131 ασθενείς από 114 μη συγγενείς οικογένειες (17 Ελληνικές, 2 Γερμανικές, 26 Ισπανικές, 8 Πολωνικές, 8 Ιρανικές, 53 Ουγγρικές) με U-HAE. Η παρουσία της μετάλλαξης ελέγχθηκε με PCR του εξονίου 2 και αλληλούχηση κατά Sanger. Η μετάλλαξη *ANGPT-1* p.A199S δεν ανιχνεύθηκε στους ασθενείς που εξετάστηκαν, ωστόσο ανιχνεύθηκε σε μέλος της ιταλικής οικογένειας που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

Μεταλλάξεις σε άλλη περιοχή της αγγειοποιητίνης ή σε άλλα σημαντικά γονίδια του μονοπατιού της βραδυκινίνης, πιθανώς να αποτελούν τη γενετική βάση του U-HAE στους ασθενείς αυτούς. Απαιτείται, λοιπόν, περαιτέρω διερεύνηση για βλάβες στο γονίδιο της *ANGPT-1* αλλά και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της βραδυκινίνης, ώστε να αναγνωρισθούν νέοι στόχοι για τη διάγνωση του κληρονομικού αγγειοοιδήματος.

ABSTRACT

Hereditary angioedema (HAE) is a rare genetic disease, wherein the 80-85% of the cases is occurred by C1-INH deficiency and the variants of the FXII gene. However, in a series of patients diagnosed with HAE there is no etiology recognition described yet, and the pathophysiology of the disease remains unknown (U-HAE). The identification of the causative genes that involve in the U-HAE's pathophysiology is crucial for the diagnosis and the further understanding of the disease. One such gene is the ANGPT-1 gene, which is part of the bradykinin pathway, offering a potential mechanism for the U-HAE's emergence.

Recently, a research made to the Italian population proved the mutation p.A199S in the ANGPT-1 gene as pathogenic for the development of HAE. This mutation could result in the development of U-HAE via downregulation of ANGPT-1 with subsequent the increasing of the bradykinin's concentration in plasma.

Based on these results, we made a research in order to observe the presence of the variant p.A199S among patients belonging to 114 non relevant families (14 Greek, 2 German, 26 Spanish, 8 Polish, 8 Iranian, 53 Hungarian) who display the clinical picture of U-HAE. The presence of the mutation was identified by PCR of exon 2 and Sanger sequencing method. The variant p.A199S was not detected in any of the patients who has been examined, but it was observed in a member of an Italian family and used as a positive control.

Several mutations that exist in other regions of angiotensin or on other significant genes that are part of the bradykinin pathway could probably constitute the genetic base of U-HAE in these patients. So, further research is required on the genetic impairment both of ANGPT-1 and the other genes involved in the bradykinin's metabolism, in order to identify new gene-target for the diagnosis for hereditary angioedema.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ΗΑΕ είναι ένα σπάνιο γενετικό νόσημα που ορίζεται ως εντοπισμένο και αυτοπεριορισμένο οίδημα του υποδόριου και υποβλεννογόνου ιστού, λόγω προσωρινής αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας που προκαλείται από την απελευθέρωση αγγειοδραστικών διαμεσολαβητών. Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο και χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενα επεισόδια οιδήματος σε χέρια, πόδια, πρόσωπο, δέρμα, γενετικές περιοχές, εσωτερικά όργανα και στο αναπνευστικό σύστημα [1] [2].

Είναι σημαντικός ο διαχωρισμός μεταξύ του αγγειοοιδήματος που παρουσιάζεται με πομφούς το οποίο αποτελεί εκδήλωση κνίδωσης και στο αγγειοοίδημα χωρίς πομφούς που αποτελεί μια ξεχωριστή οντότητα [3].

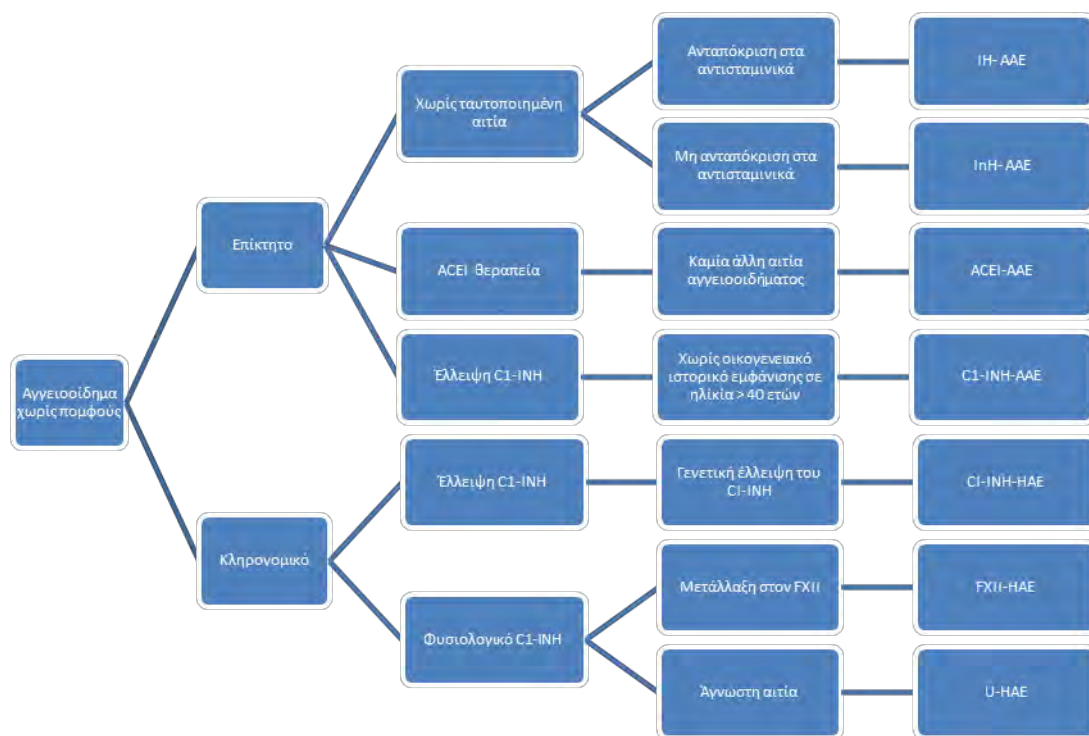
Σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες ταξινόμησης του αγγειοοιδήματος του 2009, το αγγειοοίδημα χωρίς πομφούς μπορεί επιπροσθέτως να κατηγοριοποιηθεί σε κληρονομικό (ΗΑΕ) και επίκτητο (ΑΑΕ). Η γενετική ανεπάρκεια του C1-INH είναι το αίτιο του πιο κοινού τύπου ΗΑΕ [4]. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) αναγράφονται λεπτομερώς οι κατηγορίες στις οποίες διακρίνεται το αγγειοοίδημα.

Το 2000, οι Bork et al. περιέγραψαν μία μορφή κληρονομικού αγγειοοιδήματος χωρίς ανεπάρκεια του C1-INH διευρύνοντας επιπλέον το φάσμα των τύπων αγγειοοιδήματος [5]. Αναγνωρίστηκε η ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο FXII σε ορισμένους ασθενείς, οι οποίοι ταξινομούνται στη κατηγορία ασθενών με FXII-HAE [6]. Ωστόσο, σε περίπου 5% των περιπτώσεων ασθενών με nC1INH-HAE δεν έχουν εντοπιστεί γενετικές βλάβες, ενώ περίπου 70% των ασθενών με οικογενειακό ιστορικό για τη νόσο, που είχαν φυσιολογικά επίπεδα C1-INH, δεν φέρουν μετάλλαξη στα γονίδια που ελέγχονται (SERPING1,FXII). Αυτός ο τύπος αγγειοοιδήματος αναφέρεται ως unknownHAE (U-HAE) [7].

Για τον λόγο αυτό πραγματοποιούνται έρευνες με στόχο την διερεύνηση των αιτιολογικών γονιδίων, στοιχείο πολύτιμο για την κατανόηση της εμφάνισης της νόσου. Γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις θα μπορούσαν να σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου είναι εκείνα που εμπλέκονται στο μονοπάτι της βραδυκινίνης, καθώς αποτελεί πολυπεπτιδίο του πλάσματος που επιδρά στην διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων. Τέτοιου είδους γονίδια, είναι αυτά του PLG και της ANGPT-1, που όπως έχει ήδη αποδειχθεί φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση του κληρονομικού αγγειοοιδήματος [6].

Ωστόσο, έως σήμερα, ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με το γενετικό υπόβαθρο και τους μηχανισμούς που οδηγούν στην εμφάνιση του U-HAE. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η ανίχνευση της μετάλλαξης c.807G>T (p.A119S) στο γονίδιο της ANGPT-1 σε ασθενείς με U-HAE.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση διαφόρων τύπων ΗΑΕ [1]



2. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑ ΑΓΝΩΣΤΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ

2.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ U-HAE

Οι κρίσεις του U-HAE συνήθως ακολουθούν μια προκαθορισμένη πορεία, όμοια με αυτή των υπόλοιπων τύπων ΗΑΕ. Πολλά επεισόδια προμηνύονται από ένα πρόδρομο σύμπτωμα, συνήθως αίσθηση νυγμού, αίσθηση τάσης, θερμότητας, καύσου ή κνησμού στην προσβεβλημένη περιοχή. Τα πρόδρομα συμπτώματα είναι πιθανό να εμφανιστούν μερικές μέρες πριν την εκδήλωση της κρίσης και περιλαμβάνουν αυξημένη κόπωση, καταβολή, ναυτία, κοιλιακή διάταση, μετεωρισμό ή αυξημένη όρεξη ιδιαίτερα πριν από γαστρεντερική κρίση [8]. Το πιο χαρακτηριστικό πρόδρομο σύμπτωμα περίπου στο 1/3 των πρόδρομων εκδηλώσεων είναι το παρυφώδες ερύθημα (Εικόνα 1) ένα ψηλαφητό, ερπητοειδές, μη κνιδωτικό εξάνθημα σε κορμό, άνω ή κάτω άκρα, σπανιότερα στο πρόσωπο [9].

Σε αντίθεση με την κνίδωση, το U-HAE επηρεάζει τις βαθύτερες στοιβάδες του δέρματος. Εκδηλώνεται κλινικά με επαναλαμβανόμενο, εντοπισμένο υποδόριο ή υποβλεννογόνο οίδημα. Αν και μερικές φορές εμφανίζεται ταχέως, το οίδημα τυπικά επιδεινώνεται αργά αλλά προοδευτικά μέσα στις πρώτες 24 ώρες, μπορεί να επιμείνει για δύο έως πέντε ημέρες και συνήθως ξεκινά να υποχωρεί σταδιακά μέσα στις επόμενες 48 με 72 ώρες [10]. Οι ασθενείς τείνουν να εμφανίζουν επαναλαμβανόμενα επεισόδια με μεσοδιαστήματα ύφεσης, προτείνοντας ότι οι κρίσεις πυροδοτούνται από διακριτά ερεθίσματα, παρόλο που στους περισσότερους το αίτιο δεν είναι προσδιορίσιμο. Τα πιο κοινά ερεθίσματα είναι ο τοπικός τραυματισμός, (περιλαμβανομένου ιατρικών και οδοντιατρικών παρεμβάσεων), συναισθηματική καταπόνηση και οξεία λοίμωξη.

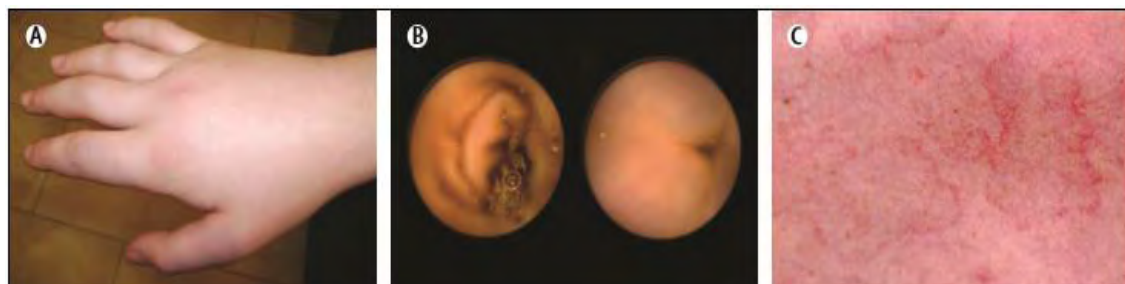
Η βαρύτητα της νόσου μπορεί να επιδεινωθεί εξαιτίας της έμμηνου ρύσεως, αντισυλληπτικών σκευασμάτων περιέχοντα οιστρογόνα, θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών [11]. Η εγκυμοσύνη έχει μεταβλητή επίδραση στη βαρύτητα της νόσου, αλλά οι κρίσεις είναι σπάνιες κατά τη γέννηση. Οι ασθενείς με U-HAE εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα αυτοάνοσων νοσημάτων [12].

Τα συχνότερα εμπλεκόμενα όργανα περιλαμβάνουν το δέρμα, τους ανώτερους αεραγωγούς και το γαστρεντερικό σωλήνα. Οι κρίσεις μπορεί να ξεκινήσουν από μια περιοχή και να επεκταθούν σε άλλη πριν υποχωρήσουν.

Εικόνα 1: Παρυφώδες ερύθημα στο άνω άκρο ασθενούς με HAE. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι βλάβες δεν είναι επηρμένες ούτε κνιδωτικές [9]



Εικόνα 2: Κλινικές εκδηλώσεις του HAE. (A) Αγγειοοίδημα του χεριού σε ασθενή με HAE. (B) Ενδοσκόπηση με κάψουλα κατά τη διάρκεια κοιλιακής προσβολής σε ασθενή με HAE, παρουσιάζοντας αυλό με φυσιολογικό βλεννογόνο (αριστερά) και οιδηματώδη μειωμένης διαμέτρου αυλό, προκαλώντας μερική εντερική απόφραξη (δεξιά). (C) Παρυφώδες ερύθημα στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα ασθενούς με HAE, 8 ώρες πριν από την έναρξη των κοιλιακών συμπτωμάτων [13]



2.2 ΕΠΙΠΤΩΣΗ

Το HAE είναι μια σπάνια γενετική ασθένεια με εκτιμώμενο επιπολασμό στον γενικό πληθυσμό από 1:10.000 έως 1: 50.000 [14]. Το HAE θεωρείται μια σπάνια οντότητα, η οποία επηρεάζει όλες τις εθνικότητες χωρίς προτίμηση όσον αφορά το φύλο [15]. Οι ασθενείς άνευ θεραπείας αντιμετωπίζουν επεισόδια κάθε επτά έως δεκατέσσερις ημέρες κατά μέσο όρο, με τη συχνότητα να κυμαίνεται από πολύ σπάνια έως κάθε τρεις ημέρες [16]. Η πλειοψηφία των ασθενών που πάσχουν από U-HAE είναι γυναίκες, ιδιαίτερα στην εγκυμοσύνη ή εκείνες που εκτίθενται σε εξωγενή οιστρογόνα (π.χ. από του στόματος αντισυλληπτικά που περιέχουν οιστρογόνο). Όλοι οι τύποι HAE συχνά επιδεινώνονται λόγω οιστρογόνων και δεν ανταποκρίνονται στα αντιισταμινικά. Επιπλέον, η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου, όπως αποδεικνύεται από μελέτες, είναι κάποια στιγμή μετά την έναρξη της εφηβείας και έχει προταθεί πως η φυσική αύξηση των οιστρογόνων μετά την εφηβεία μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του U-HAE [17] [18].

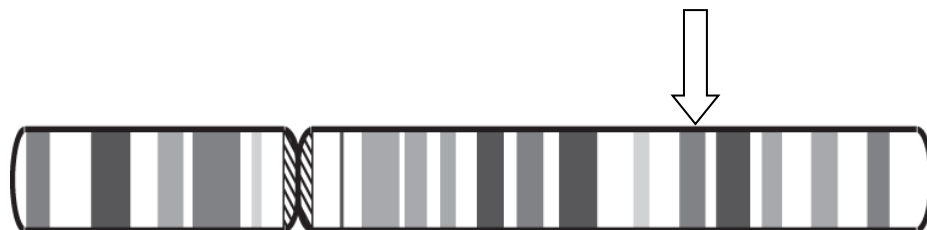
2.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το U-HAE πιθανά προκαλείται από βλάβες σε γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι της βραδυκίνης, όπως το γονίδιο της ANGPT-1. Μία πιθανή αιτία εμφάνισης της νόσου είναι οι μεταλλάξεις ενός εκ των δύο αλληλομόρφων του συγκεκριμένου γονιδίου [19].

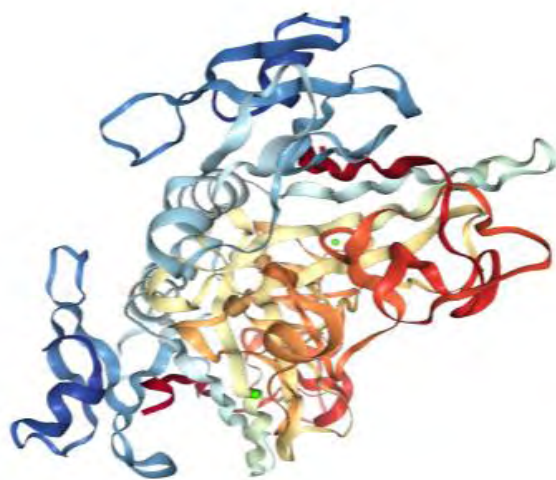
Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 8, στην θέση 8q23.1 (Εικόνα 3). Έχει μήκος 249kb και αποτελείται από 10 εξόνια. Κωδικοποιεί μία εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια της αγγειοποιητίνης. Αποτελείται από 498 αμινοξέα και έχει μέγεθος 70Kda [20]. Οι αγγειοποιητίνες μοιράζονται μία κοινή δομή με ένα μικρό αμινοτελικό μοτίβο, που ακολουθείται από μία σπειροειδή έλικα και ένα καρβοξυτελικό άκρο, περιοχή όμοια με

ινωδογόνο (Εικόνα 4) [21]. Υφίσταται μετα-μεταφραστική γλυκοζυλίωση, ενώ το εναλλακτικό μάτισμα έχει σαν αποτέλεσμα πολλαπλές παραλλαγές μεταγραφής που κωδικοποιούν ξεχωριστές ισομορφές [20]. Δρα μέσω δέσμευσης στον υποδοχέα της ενδοθηλιακής κινάσης τυροσίνης. Η δέσμευση πραγματοποιείται μέσω σύνδεσης της περιοχής ινωδογόνου που υπάρχει στο μόριο των αγγειοποιητινών [21]. Τέλος, εμπλέκεται σε ενδοθηλιακές αναπτυξιακές διεργασίες, διακρίνεται όμως από εκείνη του VEGF.

Εικόνα 3: Το χρωμόσωμα 8 και η θέση q23.1, όπου εντοπίζεται η ANGPT-1



Εικόνα 4: Δομή της ANGPT-1 με την χρήση της βάσης δεδομένων (<https://www.rcsb.org/>)



2.4 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ANGPT-1 ΚΑΙ 2

Οι αγγειοποιητίνες είναι μία σημαντική οικογένεια αιμοποιητικών παραγόντων. Τα καλύτερα μελετημένα μέλη της είναι η ANGPT-1 και η ANGPT-2. Οι δύο αυτοί παράγοντες δρουν στον ίδιο υποδοχέα στην επιφάνεια των διαφοροποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων και των EPC και συνεργάζονται στενά με τον VEGF και τους άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες στην αγγειογενετική διαδικασία [22].

Η ANGPT-1 εκφράζεται από τα περιαγγειακά κύτταρα και ασκεί σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των νεοσχηματιζόμενων αγγείων μέσω της στρατολόγησης και άλλων ειδών κυττάρων πέραν των ενδοθηλιακών και μέσω της ανακατασκευής της βασικής μεμβράνης του ενδοθηλίου. Σε φυσιολογικές συνθήκες, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των διαφοροποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο παίζει ρόλο στη διαμεσολάβηση αμοιβαίων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενδοθηλίου, της περιβάλλουσας μήτρας και του μεσεγχύματος και αναστέλλει τη ενδοθηλιακή διαπερατότητα. Επιπλέον, μεσολαβεί στην ωρίμανση και σταθερότητα του αγγείου [23]. Γενικότερα, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην πρόιμη ανάπτυξη της καρδιάς καθώς και να έχει μια πιθανή θεραπευτική χρησιμότητα αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προαγωγή αγγειογενετικών διεργασιών σε ορισμένα όργανα όπως η ισχαιμική καρδιά.

Ωστόσο, με την εμφάνιση αγγειογενετικών σημάτων, όπως του VEGF, παράγεται η ANGPT-2. Παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε μικρότερο βαθμό από τα μακροφάγα. Το 60% των αμινοξέων της ANGPT-1 και 2 είναι κοινά, ωστόσο η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας ανταγωνιστής της ANGPT-1 [24]. Επιπλέον, διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, διαταράσσει την ικανότητα αγγειακής αναδιαμόρφωσης του ANGPT-1 και μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις ασκεί και άμεση αγγειογενετική δράση, ανεξάρτητα από την ANGPT-1 [25].

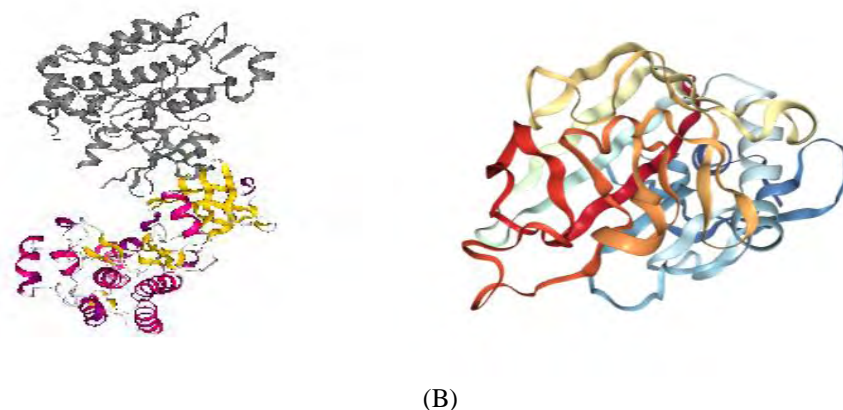
Και οι δύο δεσμεύονται σε έναν υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, τον TEK / TIE2, ο οποίος εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά σε ενδοθηλιακά και πρόιμα αιμοποιητικά κύτταρα και απαιτείται για την κανονική ανάπτυξη αγγειακών δομών κατά την εμβρυογένεση [26]. Η δέσμευση των συνδετών οδηγεί σε διμερισμό και ενεργοποίηση του υποδοχέα με αυτοφωσφορύλιωση. Η σηματοδότηση ANGPT/TIE2 ελέγχει την σύνδεση των ενδοθηλιακών και των περιαγγειακών κυττάρων. Οι πολυμερείς δομές ANGPT-1 είναι κρίσιμες για την επαγωγή της ενεργοποίησης των TIE2, ενώ τα διμερή και τα μονομερή είναι λιγότερο ικανά να δεσμεύσουν τον υποδοχέα ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα από την ANGPT-1 έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη σηματοδοτικών μονοπατιών που μεσολαβούν στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και τα αντιφλεγμονώδη νοσήματα [27].

Ο δεύτερος συνδέτης του, ANGPT-2, δρα ως μερικός ανταγωνιστής. Αναστέλλει την σηματοδότηση παρουσία της ANGPT-1 αλλά τον ενεργοποιεί ασθενώς απουσία της. Η ικανότητα της ANGPT-2 να ενεργοποιεί τον υποδοχέα εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου. Για παράδειγμα στα ενδοθηλιακά κύτταρα αδυνατεί να τον ενεργοποιήσει, αν και όταν υπάρχει σε υψηλές συγκεντρώσεις ή για παρατεταμένες περιόδους μπορεί να τον διεγείρει. Σε μη ενδοθηλιακά κύτταρα, ωστόσο δρα ως αγωνιστής [28].

Η ισορροπία μεταξύ της έκφρασης των ANGPT-1 και ANGPT-2 είναι σημαντική για την αγγειογένεση, το σχηματισμό, την ανάπτυξη και τη σταθεροποίηση των αιμοφόρων αγγείων [16]. Επιπλέον, η αναλογία ANGPT-2 / ANGPT-1, αποτελεί δείκτη αστάθειας των αγγείων και μία βέλτιστη αντανάκλαση του ισοζυγίου ANGPT [25].

Τέλος, ένας ακόμα μηχανισμός της ANGPT-1 που φαίνεται να επιδρά στην εμφάνιση του κληρονομικού αγγειοιδήματος είναι αυτός στο μονοπάτι της βραδυκινίνης, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο.

Εικόνα 5: Δομή της ANGPT-2 (A) και του υποδοχέα TEK/TIE2 (B) με την χρήση βάσης δεδομένων (<https://www.rcsb.org/>)



3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΡΑΔΥΚΙΝΙΝΗΣ

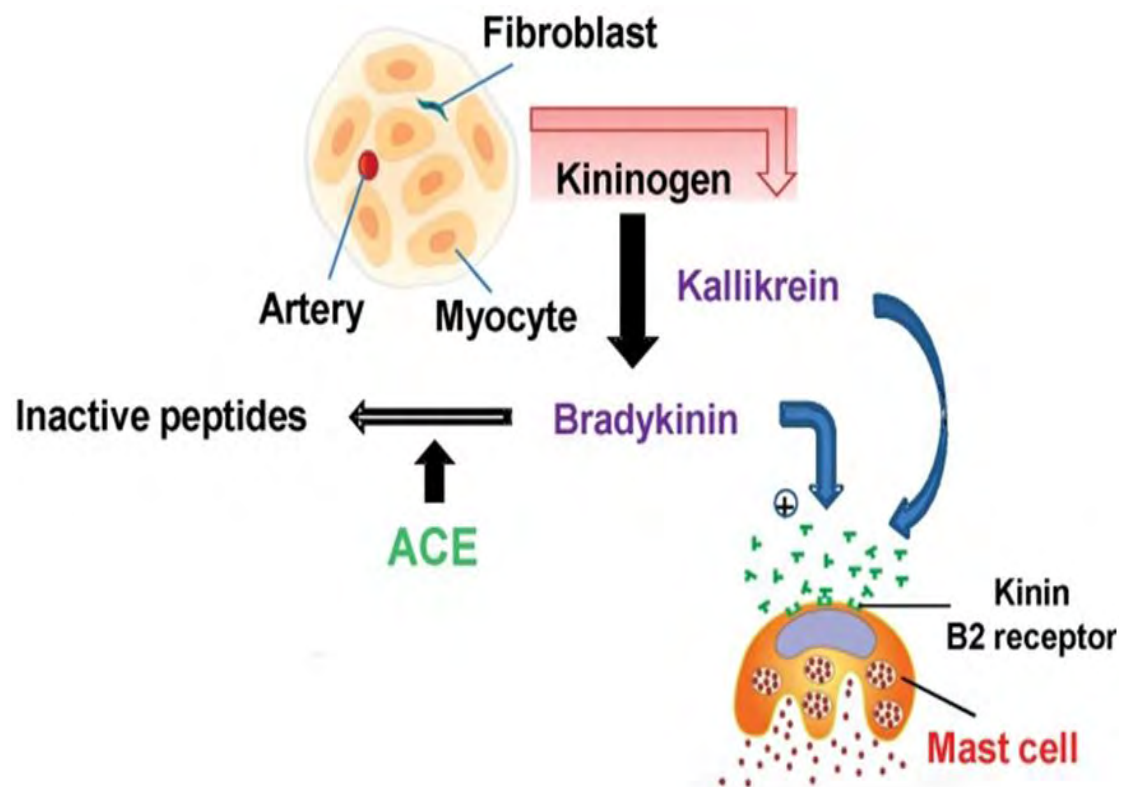
Η βραδυκινίνη είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από εννέα αμινοξέα δημιουργούμενο από το HK, κατόπιν διάσπασης από την PK, ενώ μέσω δράσης του ACEi αδρανοποιείται (Εικόνα 6) [29]. Απελευθερώνεται στο πλάσμα του αίματος σε περίπτωση ασθένειας ή τραύματος, έχει αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται για την παραγωγή αντιυπερτασικών φαρμάκων [30]. Θεωρείται το πλέον αντιπροσωπευτικό μέλος των πολυπεπτιδικών ουσιών που αναφέρονται με το γενικό όρο κινίνες. Σε αντίθεση με την

ισταμίνη και την σεροτονίνη δεν ανευρίσκεται αποθηκευμένη, αλλά παράγεται στο πλάσμα από την πρόδρομο ουσία α -2-σφαιρίνη υπό την επίδραση του ενζύμου κινινογενάση.

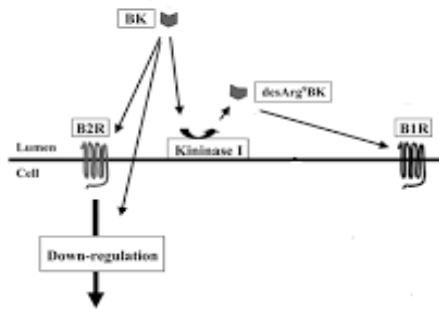
Η βραδυκίνη προκαλεί αύξηση της διαμέτρου των αιμοφόρων αγγείων και αυξημένη δίοδο υγρών διαμέσου του τοιχώματος των αγγείων, και αυτό γίνεται εμφανές ως πρήξιμο (αγγειοοίδημα). Έχει αποδειχτεί ότι συμβάλλει ενεργά στην εκδήλωση της αλλεργικής φλεγμονώδους αντίδρασης και στην παθογένεια των αλλεργικών καταστάσεων. Οι δράσεις της κατευθύνονται μέσω αλληλεπίδρασης με ειδικούς υποδοχείς B1 και B2. Μέσω της ενεργοποίησής τους, εξασκεί τις βιολογικές της δράσεις όπως τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και την διαμεσολάβηση των κλασσικών συμπτωμάτων της φλεγμονής, την αγγειοδιαστολή, την ερυθρότητα, την τοπική αύξηση θερμοκρασίας, το οίδημα και τον πόνο. Η δέσμευση της βραδυκίνης στον B1R πραγματοποιείται μετά την μετατροπή της σε Des-Arg9-βραδυκίνη (Εικόνα 7) [30] [31].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το πολυμερές της ANGPT-1 δεσμεύεται στον υποδοχέα TIE2 και τον ενεργοποιεί (Εικόνα 8). Με τον τρόπο αυτό η ANGPT-1 παρεμβάλλεται στο μονοπάτι της βραδυκίνης και του VEGF, οι οποίοι επιδρούν στην αγγειακή διαπερατότητα, αναστέλλοντας την απελευθέρωσή τους και άρα την εμφάνιση του αγγειοοιδήματος [7].

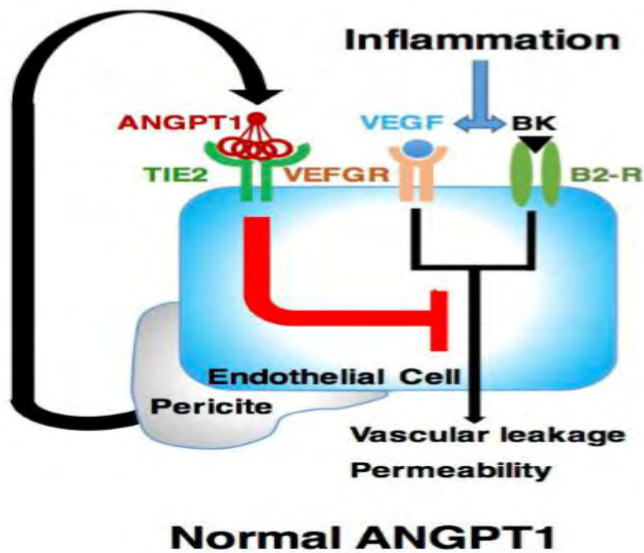
Εικόνα 6: Μονοπάτι σχηματισμού της βραδυκίνης [32]



Εικόνα 7: Η δέσμευση της βραδυκίνης στον B1 και B2 υποδοχέα [33]



Εικόνα 8: Μονοπάτι σύνδεσης της ANGPT-1 και της βραδυκίνης [7]



4. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ANGPT-1

Καθώς η ANGPT-1 φαίνεται πως συμμετέχει στην αγγειακή ανάπτυξη και αγγειογένεση, οι Bafuno et al το 2017 διερεύνησαν εάν βλάβες στο γονίδιο συσχετίζονται με την εμφάνιση του U-HAE [7]. Η συγκεκριμένη έρευνα, στον ιταλικό πληθυσμό, αποκάλυψε την παρουσία τριών μεταλλάξεων στο γονίδιο: της c.807G>T (p.A119S), της c.673C>T (p.R225C) και της c.1478G>A (p.R494Q) [7] [35].

Η μετάλλαξη c.807G>T (p.A119S, rs764987358) εντοπίζεται στο εξόνιο 2. Εντοπίζεται εντός του πρώτου τμήματος του τομέα της σπειροειδούς έλικας (Εικόνα 9) και ανιχνεύθηκε σε 4 ασθενείς της ίδιας οικογένειας από 10 οικογένειες με U-HAE, ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε 47 υγιείς δότες ούτε σε 7 μη πάσχοντα μέλη της οικογένειας [7] (Εικόνα 10). Σύμφωνα με τη βάση ExAC, η μετάλλαξη έχει ανιχνευθεί μία φορά σε ευρωπαϊκό (συχνότητα 0,001%) και καμία σε οποιονδήποτε άλλο πληθυσμό (συχνότητα <0.001%). Προβλέπεται ως πιθανώς παθογονική από τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και Polyphen.

Η δεύτερη μετάλλαξη c.673C>T (p.R225C, rs777414772) εντοπίζεται στο εξόνιο 4. Έχει ανιχνευθεί τέσσερις φορές σε ασιατικό και δύο φορές σε ευρωπαϊκό πληθυσμό (συχνότητα 0,02%, 0,003% αντίστοιχα) (ExAC). Σύμφωνα με βιοπληροφορικά εργαλεία (polyphen, SIFT) προβλέπεται ως πιθανώς παθογονική.

Τέλος, στο εξόνιο 9 ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη c.1478G>A (p.R494Q, rs377442517). Έχει ανιχνευθεί 15 φορές στους 121306 στον παγκόσμιο πληθυσμό (συχνότητα 0,01%) και προβλέπεται από τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και Polyphen ως πιθανώς παθογονική (Εικόνα 11) [7] [34].

Οι ερευνητές εστίαστηκαν στην περαιτέρω μελέτη της p.A119S, καθώς δεν σχετίζεται άμεσα ούτε με το σύστημα επαφής, ούτε με τους υποδοχείς βραδυκινίνης, όπως συμβαίνει με τους μέχρι τώρα ταυτοποιημένους τύπους HAE, αλλά με την παρεμβολή αυτής στο μονοπάτι της βραδυκινίνης.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το προϊόν του γονιδίου διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση ενώ η πλήρης ανεπάρκεια της πρωτεΐνης στον άνθρωπο δεν είναι βιώσιμη. Η μετάλλαξη προκαλεί μόνο μερική ανεπάρκεια της πρωτεΐνης.

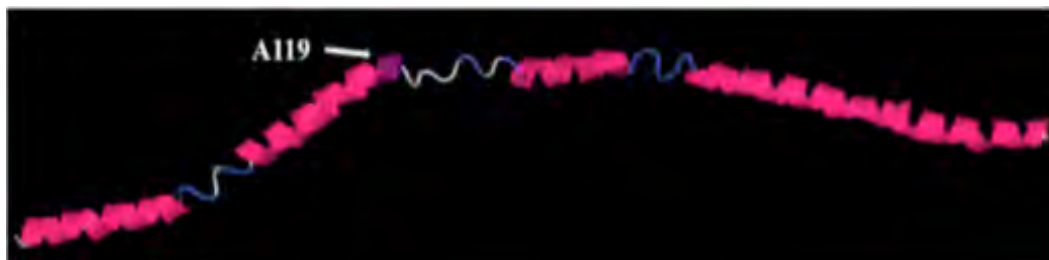
Η αντικατάσταση ενός υδρόφιλου από ένα υδρόφοβο κατάλοιπο προτείνεται ότι αλλάζει την πρωτεϊνική δομή, επιδρώντας σημαντικά στη λειτουργικότητα. Ποσοτική ανάλυση αποκάλυψε μείωση στις πολυμερικές μορφές και μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης της ANGPT-1 στους ασθενείς που φέρουν τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη συγκριτικά με υγιείς συγγενείς.

Μεταλλαγμένες σειρές HEK293 κυττάρων τα οποία είτε εκφράζουν την ANGPT-1 αγρίου τύπου, είτε τις τρεις μεταλλαγμένες δομές της πρωτεΐνης, έδειξαν ότι η μετάλλαξη p.A119S οδηγεί σε ποσοτική μείωση των πολυμερών περίπου κατά το ένα τρίτο, με αποτέλεσμα την αδυναμία δέσμευσή της στον υποδοχέα TIE2 [7].

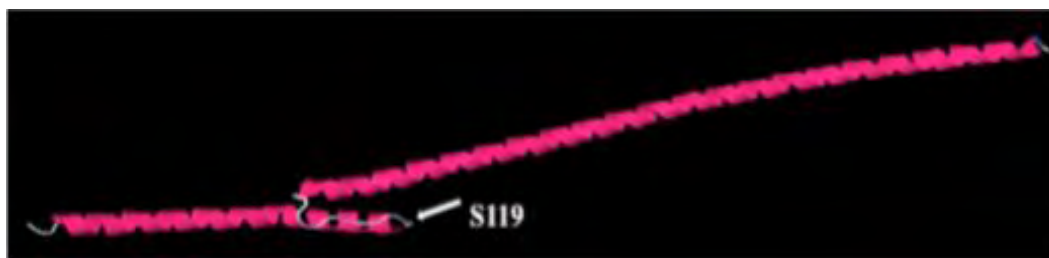
Τέλος, σε ασθενείς που φέρουν την μετάλλαξη p.A119S βρέθηκε μειωμένη αναλογία ANGPT1 / ANGPT2 σε σύγκριση με υγιή άτομα ελέγχου [36].

Δεδομένου λοιπόν, πως η ANGPT-1 εμπλέκεται στο μονοπάτι της βραδυκινίνης και κατ'επέκταση στην αγγειακή διαπερατότητα είναι εύλογο να ερευνηθούν οι συνέπειες της μετάλλαξης στην παθογένεια του U-HAE, καθώς αποτελεί οίδημα του υποδόριου και υποβλεννογόνου ιστού λόγω προσωρινής αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας που προκαλείται από την απελευθέρωση αγγειοδραστικών διαμεσολαβητών.

Εικόνα 9: Η μετάλλαξη p.A119S στο μόριο της πρωτεΐνης ANGPT-1 [7]. Στην (Α) απεικονίζεται η αγρίου τύπου ενώ στην (Β) η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη

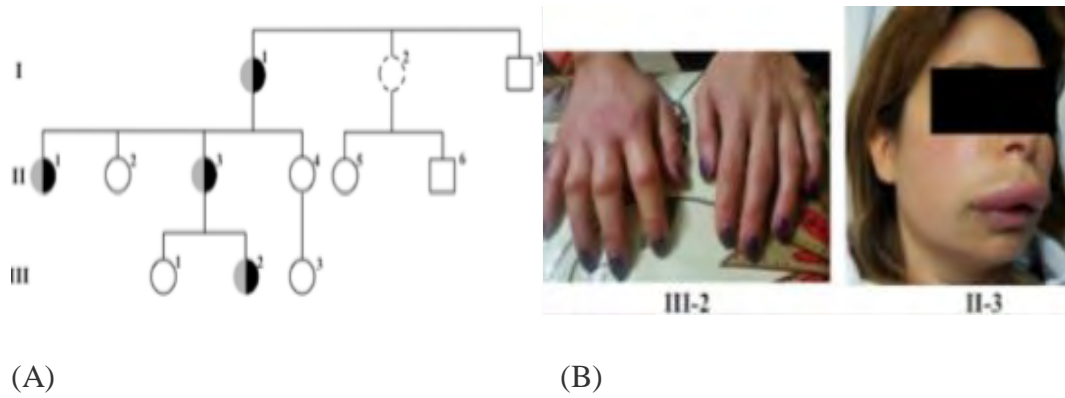


(A)

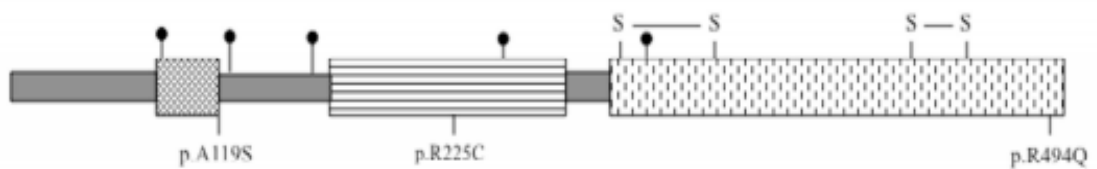


(B)

Εικόνα 10: Στην (A) απεικονίζεται το γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας. Για το άτομο I-2 δεν πραγματοποιήθηκε εξέταση. Στην (B) φανερόνται οι ιδήματα στα χέρια για το άτομο III-2 και προσώπου-χειλιών για το άτομο II-3 κατά την διάρκεια κρίσεων [7]



Εικόνα 11: Σχηματική παρουσίαση των μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη ANGPT-1 [7]



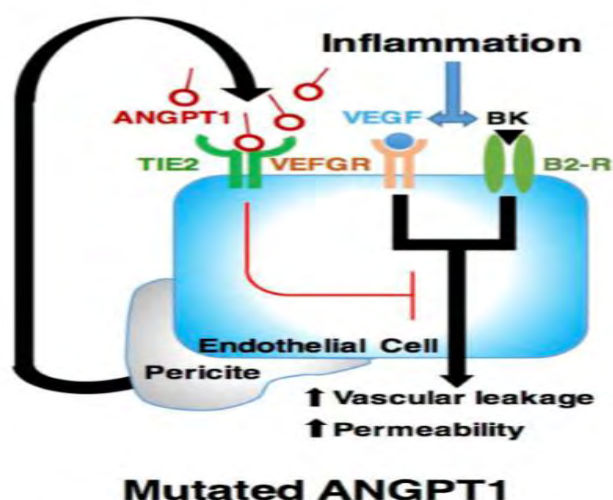
5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ANGPT-1 ΣΤΗΝ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΒΡΑΔΥΚΙΝΙΝΗΣ

Η σηματοδότηση ANGPT-1-TIE2 όπως είναι γνωστό, σταθεροποιεί το αγγειακό σύστημα και μειώνει την αγγειακή διαπερατότητα μέσω της παρεμπόδισης της απελευθέρωσης της βραδυκινίνης και του VEGF. Όμως, η μετάλλαξη p.A119S παρεμποδίζει την ικανότητα της ANGPT-1 να σχηματίζει πολυμερή, οδηγώντας σε μείωση της ικανότητας της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης να δεσμεύεται στον συγγενή υποδοχέα της, με αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης της ANGPT-1 στο πλάσμα και άρα απελευθέρωση της βραδυκινίνης με επακόλουθο αποτέλεσμα το αγγειοίδημα (Εικόνα 12) [7].

Τα δεδομένα αυτά, παρέχουν ένα εύλογο μηχανισμό με τον οποίο το αγγειακό σύστημα, σε ασθενείς με p.A119S, γίνεται επιρρεπές σε αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα που προκαλείται από μια ποικιλία μεσολαβητών, και όχι απλώς από την βραδυκινίνη [36].

Συμπερασματικά, μια μερική εξασθένηση της ANGPT-1 σχετίζεται με αγγειοίδημα και οι παραλλαγές της μπορούν να αναγνωριστούν ως η τρίτη αιτία του HAE. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν νέους και ανεξάρτητους μηχανισμούς που οδηγούν σε αγγειακή διαπερατότητα και αγγειοίδημα και αξίζει να διερευνηθούν περαιτέρω σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών U-HAE.

Εικόνα 12: Επίδραση της μετάλλαξης p.A119S στην αγγειακή διαπερατότητα [7]



6. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ U-HAE

Οι ασθενείς με κληρονομικό αγγειοοίδημα, φυσιολογικό C1-INH και απροσδιόριστο γενετικό έλλειμμα κατατάσσονται στην κατηγορία των ασθενών με U-HAE [37].

Η συμπτωματολογία του nC1-INH-HAE είναι παρόμοια με εκείνη της ανεπάρκειας C1-INH, και η απουσία κνίδωσης και ανταπόκρισης των συμπτωμάτων στα αντισταμινικά/κορτικοστεροειδή υποστηρίζουν μια μη-ισταμινεργική διεργασία. Τα οιστρογόνα είναι γνωστό ότι ενισχύουν την ενεργοποίηση του συστήματος PK-βραδυκινίνη [38] και επιδεινώνουν τις εκδηλώσεις της νόσου στους ασθενείς με nC1-INH-HAE [39]. Η παρατήρηση ότι οι περισσότεροι ασθενείς με nC1-INH-HAE είναι γυναίκες οι οποίες εμφανίζουν αρχικά τα συμπτώματα μετά την εφηβεία προτείνει ένα πιθανό ρόλο για τα οιστρογόνα στην παθογένεια της νόσου. Ο διαχωρισμός οιστρογονοεξαρτώμενου και μη οιστρογονοεξαρτώμενου αγγειοοιδήματος υποστηρίζεται από την προαναφερόμενη επιδείνωση της συμπτωματολογίας σε καταστάσεις αυξημένων οιστρογόνων εξαιτίας εξωγενούς χορήγησης ή ενδογενούς παραγωγής [40]. Όμως η έναρξη των συμπτωμάτων σε μερικές γυναίκες προεφηβικής ηλικίας, η επιμονή της νόσου μετά την εμμηνόπαυση και η παρουσία της ασθένειας σπανίως σε άνδρες προτείνουν ότι η νόσος δεν είναι οιστρογονοεξαρτώμενη, αλλά ότι η ορμόνη είναι ένας ισχυρός συμπαράγοντας στην φαινοτυπική έκφραση [41].

Σε μια συγκεντρωτική μελέτη 138 ασθενών με nC1-INH-HAE, η πλειοψηφία είχε συμπτώματα δερματικού οιδήματος (92.8%), οιδήματος προσώπου (53.6%) και κοιλιακής προσβολής (50%). Το οίδημα λάρυγγα (25.4%) και σταφυλής (21.7%) ήταν επίσης συχνά, ενώ το οίδημα άλλων οργάνων σπάνιο (3.6%). Σε πολλές γυναίκες η συμπτωματολογία εκλυόταν με τη χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών, θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης ή εγκυμοσύνη [37].

Η διάγνωση του U-HAE βασίζεται καθαρά σε κλινικά κριτήρια και απαιτεί οι ασθενείς να διαθέτουν: 1) τα προαναφερόμενα συμπτώματα, 2) ένα ή παραπάνω οικογενειακά μέλη με την ίδια συμπτωματολογία, 3) αποκλεισμό οικογενούς και κληρονομικής κνίδωσης, 4) φυσιολογικά επίπεδα ποσοτικού και λειτουργικού C1-INH και 5) απουσία μετάλλαξης στον FXII σχετιζόμενη με αγγειοοίδημα [42].

Πολύ πρόσφατα βλάβες σε άλλα γονίδια ενοχοποιούνται για περιστατικά U-HAE. Όπως ήδη προαναφέρθηκε η πρόσφατα ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στο γονίδιο της ANGPT-1, έχει ταυτοποιηθεί ως αιτία για την εμφάνιση του αγγειοοιδήματος σε μία ιταλική οικογένεια με U-HAE [7]. Η μετάλλαξη στη θέση p.119 βρίσκεται στο τέλος μιας περιοχής η οποία θεωρείται κρίσιμη για τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης [34]. Πιθανόν οδηγεί σε τροποποίηση της αγγειακής διαπερατότητας προκαλώντας υποτροπιάζον αγγειοοίδημα το οποίο μεσολαβείται από βραδυκινίνη [43] και στοχεύει μηχανισμούς κλειδιά που συνεισφέρουν στη διατήρηση του ενδοθηλιακού φραγμού, αναστέλλοντας τις επιδράσεις παραγόντων μεταξύ των οποίων είναι και ο VEGF [44].

Τέλος, στους ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία nC1-INH-HAE έχει ανιχνευθεί πρόσφατα μετάλλαξη στο γονίδιο του PLG. Η μετάλλαξη c.9886A>G βρίσκεται στο εξόνιο 9 και οδηγεί στην παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη p.Lys330Glu στην περιοχή kringle 3. Η μετάλλαξη πιθανόν οδηγεί σε δομικές αλλαγές που τροποποιούν τη λειτουργία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης PLG. Οι περισσότεροι ασθενείς με μετάλλαξη στο PLG εμφανίζουν οίδημα προσώπου/χειλέων (78.3%) και γλώσσας (78.3%), καθώς και το 8.7% των οιδημάτων γλώσσας συσχετίστηκαν με δύσπνοια, αλλαγές φωνής ενώ δύο ασθενείς είχαν καταλήξει λόγω ασφυξίας [42].

ΣΚΟΠΟΣ

Από την πρώτη περιγραφή του U-HAE, έχει γίνει ελάχιστη πρόοδος σε ότι αφορά την ανάπτυξη διαγνωστικών κριτηρίων. Έτσι, η έλλειψη ξεκάθαρων διαγνωστικών κριτηρίων για τη σωστή διάγνωση αυτών των ασθενών, έχει περιορίσει σημαντικά τον αριθμό μελετών που σχετίζονται με το νόσημα. Επιπλέον, ελάχιστα είναι γνωστά σχετικά με το γενετικό υπόβαθρο και τους μηχανισμούς που οδηγούν στην εμφάνιση του U-HAE. Ωστόσο, η μετάλλαξη p.A119S στο γονίδιο της ANGPT-1 θα μπορούσε να ευθύνεται για την εμφάνιση του U-HAE, καθώς επιδρά στο μονοπάτι της βραδυκινίνης και αποδεικνύει έναν εύλογο μηχανισμό εμφάνισης του αγγειοοιδήματος. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η ανίχνευση της μετάλλαξης σε ασθενείς που εμφανίζουν την κλινική εικόνα του HAE χωρίς να έχει αναγνωριστεί παθογονική γενετική βλάβη.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν εκατόν τριάντα ένα ασθενείς με U-HAE από εκατόν δεκατέσσερις μη συγγενείς οικογένειες (17 Ελληνικές, 2 Γερμανικές, 26 Ισπανικές, 8 Πολωνικές, 8 Ιρανικές, 53 Ουγγρικές οικογένειες) προηγουμένως τυποποιημένες για τα γονίδια *SERPING1*, *PLG* και *F12*. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν 30 Ισπανικά, 8 Πολωνικά, 8 Ιρανικά, 17 Έλληνικά, 2 Γερμανικά και 66 Ουγγρικά δείγματα. Ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας για την παρουσία της μετάλλαξης c.807G>T (p.A119S) χρησιμοποιήθηκαν 2 προηγουμένως τυποποιημένα δείγματα της Ιταλικής οικογένειας με κληρονομικό αγγειοοίδημα [7]. Τα Ιταλικά δείγματα, παραχωρήθηκαν για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης πτυχιακής έπειτα από συνεννόηση με τους ίδιους τους ερευνητές.

Το ιατρικό ατομικό ιστορικό των ασθενών (Πίνακας 2) περιλάμβανε πληροφορίες όπως η ηλικία έναρξης της νόσου, καθώς και τον ετήσιο αριθμό επεισοδίων. Η μελέτη είχε λάβει έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και οι συμμετέχοντες είχαν δώσει την έγγραφη συγκατάθεσή τους.

Τα δείγματα προήλθαν από συνεργασίες της Ελλάδας και του εξωτερικού. Πιο συγκεκριμένα αναφέρονται παρακάτω: 1) Ουγγρικό Κέντρο Αγγειοιδήματος, 3ο Τμήμα Παθολογίας, Πανεπιστήμιο Semmelweis, Βουδαπέστη, Ουγγαρία. 2) Τμήμα Αλλεργιολογίας, Νοσοκομείο Ναυτικού, Αθήνα, Ελλάδα. 3) Τμήμα Ανοσολογίας & Ιστοσυμβατότητας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα. 4) Μονάδα Αλλεργίας, 2η Παιδιατρική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Παιδικό Νοσοκομείο «Π. Α. Κυριακού», Αθήνα. 5) Τμήμα Αλλεργίας και Κλινικής Ανοσολογίας, 424 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Εκπαιδύσεως, Θεσσαλονίκη. 6) Τμήμα Κλινικής και Περιβαλλοντικής Αλλεργιολογίας, Jagiellonian University Medical College, Κρακοβία, Πολωνία. 7) Τμήμα Δερματολογίας και Αλλεργίας, Charité - Universitätsmedizin Βερολίνου, Γερμανία. 8) Μονάδα αναφοράς αγγειοιδήματος στην Ανδαλουσία, Τμήμα Αλλεργίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Virgen del Rocío, Σεβίλλη, Ισπανία. 9) Τμήμα Ανοσολογίας, Άσθματος και Αλλεργίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τεχεράνη, Ιράν.

Πίνακας 2: Ατομικό ιστορικό ασθενών με U-HAE

Family code	Ethnicity	Name	HAE Type	Family history	Age	Pateint's age at disease onset	Mean number of attacks / year
1	SP	SEV/SP 204/1	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
2	SP	SEV/SP 205/1	U-HAE	NO	43	30	4
3	SP	SEV/SP 208/1	U-HAE	YES	38	14	4
4	SP	SEV/SP 210/1	U-HAE	YES	38	27	12
5	SP	SEV/SP 213/1	U-HAE	YES	37	23	4
6	SP	SEV/SP 215/1	ACEi	NO	58	45	6
7	SP	SEV/SP 224/1	U-HAE	YES	52	19	3-4
7	SP	SEV/SP 224/2	U-HAE	YES	27	17	4
8	SP	SEV/SP 230/1	U-HAE	YES	38	14	3-4
9	SP	SEV/SP 239/1	U-HAE	YES	51	23	6
10	SP	SEV/SP 242/1	U-HAE	YES	31	17	12
11	SP	SEV/SP 245/1	IH-AAE	NO	25	17	3
12	SP	SEV/SP 251/1	U-HAE	YES	42	10	35-40
13	SP	SEV/SP 258/1	U-HAE	YES	34	14	24
14	SP	SEV/SP 262/1	U-HAE	YES	96	73	4
14	SP	SEV/SP 262/2	U-HAE	YES	63	30	SPORADIC
15	SP	SEV/SP 265/1	U-HAE	YES	55	38	12
15	SP	SEV/SP 265/2	U-HAE	YES	80	60	12

Family code	Ethnicity	Name	HAE Type	Family history	Age	Pateint's age at disease onset	Mean number of attacks / year
16	SP	SEV/SP 268/1	U-HAE	YES	44	31	27-30
17	SP	SEV/SP 304/1	U-HAE	YES	27	12	6
17	SP	SEV/SP 304/2	IH-AAE	YES	34	19	4
18	SP	SEV/SP 306/1	U-HAE	YES	23	13	SPORADIC
19	SP	SEV/SP 311/1	U-HAE	YES	33	27	12
20	SP	SEV/SP 312/1	U-HAE	YES	59	57	12
21	SP	SEV/SP 322/1	U-HAE	YES	42	9	6
22	SP	SEV/SP 537/1	U-HAE	YES	54	44	SPORADIC
23	SP	SEV/SP 540/1	U-HAE	NO	35	30	6
24	SP	SEV/SP 547/1	U-HAE	YES	45	40	12-15
25	SP	SEV/SP 550/1	U-HAE	YES	39	30	3-4
26	SP	SEV/SP 557/1	InH-AAE	NO	21	1	24
27	HUN	L1387	U-HAE	YES	21	14	severe
28	HUN	L1469	U-HAE	YES	40	33	severe
29	HUN	L1477	U-HAE	YES	42	35	moderate
30	HUN	L1516	U-HAE	YES	26	18	severe
31	HUN	L1546	U-HAE	YES	40	34	moderate
32	HUN	L1551	U-HAE	YES	52	45	mild
33	HUN	L1554	U-HAE	N/A	10	N/A	N/A
34	HUN	L1588	U-HAE	YES	45	30	severe
35	HUN	E3	U-HAE	YES	30	25	severe
36	HUN	E13	U-HAE	YES	39	34	mild
37	HUN	E30	U-HAE	YES	45	39	moderate
38	HUN	E43	U-HAE	YES	52	46	moderate
39	HUN	E46	U-HAE	YES	29	25	moderate
40	HUN	E47	U-HAE	YES	40	35	severe
41	HUN	E50	U-HAE	YES	38	34	severe
42	HUN	E51	U-HAE	YES	93	88	severe
43	HUN	E53	U-HAE	YES	57	52	moderate
44	HUN	E59	U-HAE	YES	40	35	severe
45	HUN	E62	U-HAE	YES	61	56	severe
46	HUN	E65	U-HAE	YES	47	42	moderate
47	HUN	E68	U-HAE	YES	44	39	moderate
48	HUN	E69	U-HAE	YES	50	45	severe
49	HUN	E72	U-HAE	YES	39	34	severe
50	HUN	E74	U-HAE	YES	26	21	moderate
51	HUN	E91	U-HAE	YES	25	20	moderate
51	HUN	E92	U-HAE	YES	46	41	moderate
51	HUN	E94	U-HAE	YES	27	22	mild
52	HUN	E97	U-HAE	YES	47	43	severe
53	HUN	E114	U-HAE	YES	30	28	moderate
54	HUN	E116	U-HAE	YES	60	56	moderate

Family code	Ethnicity	Name	HAE Type	Family history	Age	Pateint's age at disease onset	Mean number of attacks / year
55	HUN	E117	U-HAE	YES	17	13	moderate
56	HUN	E118	U-HAE	YES	13	10	moderate
56	HUN	E119	U-HAE	YES	17	13	moderate
56	HUN	E120	U-HAE	YES	40	36	moderate
57	HUN	E124	U-HAE	YES	48	45	severe
58	HUN	E127	U-HAE	YES	10	6	moderate
59	HUN	E136	U-HAE	YES	21	18	severe
60	HUN	E139	U-HAE	YES	10	6	moderate
60	HUN	E142	U-HAE	YES	75	71	moderate
61	HUN	E143	U-HAE	YES	59	55	severe
62	HUN	E147	U-HAE	YES	61	58	severe
63	HUN	E153	U-HAE	YES	44	41	moderate
63	HUN	E154	U-HAE	YES	17	15	severe
64	HUN	E160	U-HAE	YES	42	39	severe
65	HUN	E171	U-HAE	YES	45	43	mild
65	HUN	E172	U-HAE	YES	18	15	moderate
66	HUN	E175	U-HAE	YES	37	34	severe
67	HUN	E192	U-HAE	YES	43	40	severe
67	HUN	E193	U-HAE	YES	58	55	moderate
68	HUN	E200	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
68	HUN	E201	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
69	HUN	E203	U-HAE	YES	47	39	moderate
69	HUN	E204	U-HAE	YES	17	15	moderate
70	HUN	E212	U-HAE	YES	14	12	moderate
70	HUN	E231	U-HAE	YES	40	38	severe
71	HUN	E214	U-HAE	YES	37	35	moderate
72	HUN	E227	U-HAE	YES	11	9	severe
73	HUN	E228	U-HAE	YES	48	44	moderate
74	HUN	E229	U-HAE	YES	47	45	severe
75	HUN	E230	U-HAE	YES	45	43	severe
76	HUN	E232	U-HAE	YES	66	64	severe
76	HUN	E233	U-HAE	YES	44	42	severe
77	HUN	E234	U-HAE	YES	66	64	severe
77	HUN	E237	U-HAE	YES	41	39	severe
78	HUN	E242	U-HAE	YES	20	19	severe
79	HUN	E249	U-HAE	YES	28	24	moderate
80	POL	2017.1	InH-AAE	NO	23	18	1-2
81	POL	2017.2	InH-AAE	NO	65	59	6
82	POL	2017.3	InH-AAE	NO	27	12	1-2
83	POL	2017.4	InH-AAE	NO	19	14	4
84	POL	2017.5	InH-AAE	NO	26	26	1
85	POL	2017.6	InH-AAE	NO	34	22	5

Family code	Ethnicity	Name	HAE Type	Family history	Age	Pateint's age at disease onset	Mean number of attacks / year
86	POL	2017.7	InH-AAE	NO	38	34	2
87	POL	2017.9	InH-AAE	NO	60	57	52
88	IR	HAE6889	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
89	IR	HAE6890	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
90	IR	HAE67121	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
91	IR	HAE6620	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
92	IR	HAE6579	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
93	IR	HAE66198	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
94	IR	HAE6825	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
95	IR	HAE6891	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
96	GR	HAE 001	InH-AAE	N/A	N/A	N/A	N/A
97	GR	HAE 017	InH-AAE	N/A	N/A	N/A	N/A
98	GR	HAE 003	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
99	GR	HAE 111	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
100	GR	HAE 042	U-HAE	N/A	N/A	N/A	N/A
101	GR	HAE 002	InH-AAE	N/A	N/A	N/A	N/A
102	GR	HAE 004	InH-AAE	N/A	N/A	N/A	N/A
103	GR	HAE 012	InH-AAE	N/A	N/A	N/A	N/A
104	GR	HAE 013	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
105	GR	HAE 014	InH-AAE	N/A	N/A	N/A	N/A
106	GR	HAE 015	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
107	GR	HAE 016	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
108	GR	HAE 043	INH	N/A	N/A	N/A	N/A
109	GR	HAE 061	INH	N/A	N/A	N/A	N/A
110	GR	HAE 063	INH	N/A	N/A	N/A	N/A
111	GR	HAE 064	INH	N/A	N/A	N/A	N/A
112	GR	HAE 098	INH	N/A	N/A	N/A	N/A
113	IT	HAE 10249	WT	YES	N/A	N/A	N/A
113	IT	HAE 10250	U-HAE	YES	N/A	N/A	N/A
114	GER	HAE 10247	U-HAE	NO	55	51	1
115	GER	HAE 10252	U-HAE	NO	75	59	54

SP:Ισπανός, HUN:Ούγγρος, POL:Πολωνός, IR:Ιρανός, GR:Έλληνας, IT:Ιταλός, GER:Γερμανός, WT:Φυσιολογικό, N/A:Τα στοιχεία δεν είναι διαθέσιμα

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε εκχύλιση γενετικού υλικού από αίμα με τη χρήση του ειδικού συστήματος, iPrep Pure Link DNA Blood Kit (Cat No IS-10005, Invitrogen), σε αυτοματοποιημένο σύστημα εκχύλισης γονιδιωματικού DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στηρίζεται στην απομόνωση του γενετικού υλικού από εμπύρηννα λευκοκύτταρα και στον περαιτέρω καθαρισμό του από πρωτεΐνες και άλατα στα επόμενα στάδια. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων στοιχείων, που μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και την περιεκτικότητα του DNA και κατ' επέκταση να παρεμποδίσουν πιθανά την PCR.

Το τελικό DNA ποσοτικοποιήθηκε με το kitQubit® dsDNA HS Assay (Cat No Q32854) με τη χρήση της συσκευής Qubit 2.0 Qubit Fluorometer (Life Technologies). Η συγκέντρωση του ήταν 50-200 ng/μl. Τα δείγματα DNA είναι δυνατό να διατηρηθούν στους 4°C για μία εβδομάδα ή σε κατάψυξη (-20°C) για 4 εβδομάδες.

2.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΕΞΟΝΙΟΥ 2 ΜΕΣΩ PCR

Η PCR είναι μέθοδος πολλαπλασιασμού μίας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του με ευρεία εφαρμογή στη διάγνωση γενετικών νοσημάτων. Επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA. Τα άκρα του τμήματος που πολλαπλασιάζεται οριοθετούνται με την επιλογή δύο ολιγονουκλεοτιδίων που λειτουργούν σαν εκκινητές. Στην αντίδραση λαμβάνει χώρα πολυμερισμός με τη χρήση DNA πολυμεράσης που συνθέτει συμπληρωματική έλικα του μορίου με κατεύθυνση 5'→3'.

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι απαραίτητη η παρουσία δεσοξυριβοτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων, ειδικού διαλύματος χλωριούχου μαγνησίου και ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο υπάρχουν όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη σωστή λειτουργία της πολυμεράσης.

Η διαδικασία περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται αυτόματα από ειδικά μηχανήματα τους θερμοκυκλοποιητές (thermocyclers). Η αντίδραση παραγματοποιείται σε κύκλους. Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο (denaturation) λαμβάνει χώρα η αποδιάταξη του υποστρώματος, στο δεύτερο (annealing) η προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο και στο τρίτο και τελευταίο (extension) η επιμήκυνση των εκκινητών.

Στο τέλος κάθε κύκλου το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητή αποτελεί υπόστρωμα για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο που ξαναρχίζει με αποδιάταξη του DNA. Μια συνηθισμένη αντίδραση PCR περιλαμβάνει 25-35 κύκλους.

Με κατάλληλη επιλογή εκκινητών μπορεί να πολλαπλασιαστεί οποιοδήποτε τμήμα DNA του οποίου η αλληλουχία είναι γνωστή.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του εξονίου 2 του γονιδίου της *ANGPT-1*, όπου εντοπίζεται η μετάλλαξη p.A119S [7].

2.2.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας εφαρμόστηκε η κλασική αντίδραση πολυμεράσης. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές που αντλήθηκαν από τη διεθνή βιβλιογραφία, οι οποίοι αποσκοπούσαν στη μελέτη συγκεκριμένου αναγνωστικού πλαισίου, όπου εδράζεται το εξόνιο 2 του γονιδίου της *ANGPT-1*.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν των Bafunno et al [7]. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται η ακριβής αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης καθώς και το μήκος του προϊόντος του γονιδίου που αναμένεται μετά την ενίσχυση.

Πίνακας 3: Εκκινητές για την ενίσχυση του εξονίου 2

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μήκος(bp)	Μήκος(bp) προϊόντος PCR
<i>ANGPT-1</i>	Πρόσθιος	CCAGCGGTGTCTTGTTTTGT	20	340
	Οπίσθιος	TGCTGAAATGTGCTCTGTGT	20	

2.2.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR

Για την πραγματοποίηση της PCR από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2μl γονιδιωματικού DNA (συγκέντρωσης 50-200ng/μl) που ενισχύθηκαν σε αντίδραση συνολικού όγκου 30 μl.

Το διάλυμα των 30 μl περιείχε πέρα από το DNA κάθε ένα από τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, τον πρόσθιο και οπίσθιο εκκινητή, χλωριούχο μαγνήσιο, ρυθμιστικό διάλυμα, νερό και το απαραίτητο ένζυμο για τον πολυμερισμό, την Taq

πολυμεράση. Στους Πίνακες 4,5 παρατίθενται ο προστιθέμενος όγκος και οι συγκεντρώσεις του κάθε αντιδραστήριου.

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον Πίνακα 6. Οι αντιδράσεις διενεργήθηκαν σε αυτόματο κυκλικό θερμομετατροπέα Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermofisher), ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων τηρήθηκαν όλα τα απαραίτητα μέτρα για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων.

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια για την ενίσχυση του εξονίου 2

Αντιδραστήριο	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντωση
H ₂ O	235	
10xPCR buffer	50	
dNTP Mix	40	200 μM/dNTP
MgCl ₂ (50nM)	15	1.5 mM
Νοηματικός εκκινητής (50pmol)	10	30 pmoles
Αντι-νοηματικός εκκινητής (50pmol)	10	30 pmoles

Πίνακας 5: Στοιχεία της Taq πολυμεράσης για την ενίσχυση του εξονίου 2

	Προστιθέμενος όγκος (μl)	Τελική συγκέντωση (U)	Προέλευση
Taq πολυμεράση	6	1	Cat No 11615010, Invitrogen

Πίνακας 6: Συνθήκες για την ενίσχυση του εξονίου 2

ΓΟΝΙΔΙΟ		
ANGPT1		
Στάδιο	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	94°C	2min
Αποδιάταξη (Denaturation)	94°C	30sec
Υβριδισμός (Annealing)	64°C	30sec
Επέκταση (Extension)	72°C	30sec
Τελική επέκταση (Final Extension)	75°C	5min
Κύκλοι	35	

2.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού και ανάλυσης μορίων DNA, σύμφωνα με το μέγεθος τους. Για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων νουκλεϊνικών οξέων (περισσότερο των 100bp) χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης.

Το ουδέτερο φορτίο καθώς και η χαμηλού βαθμού χημική πολυπλοκότητα της αγαρόζης την καθιστούν ως ένα υλικό που δεν αλληλεπιδρά με τα βιομόρια. Έτσι, τα νουκλεϊνικά οξέα διαχωρίζονται μέσα σε μια πηκτή αγαρόζης εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο. Τα μικρότερα μόρια κινούνται ταχύτερα γιατί διαπερνούν πιο εύκολα από τους πόρους της πηκτής. Τα νουκλεϊκά οξέα, μετακινούνται από αρνητικά προς θετικά ηλεκτρόδια, λόγω στο φυσικά φερόμενο αρνητικό τους φορτίο που παρατηρείται στο σκελετό σακχάρου-φωσφορικής ομάδας.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η παρασκευή του πηκτώματος της αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.

Στο δεύτερο στάδιο, τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα, εφαρμόζεται η κατάλληλη ηλεκτρική τάση στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των μορίων DNA.

Το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει την παρατήρηση και φωτογράφιση του πηκτώματος σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Στην προκειμένη πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 2gr αγαρόζης (Cat No16500-500, Invitrogen) προστέθηκαν σε 100 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης Tris Acetate Acid/EDTA (TAE) (Cat No15558-042, Gibco). Το διάλυμα θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Ανεπαρκής διάλυση της αγαρόζης σε αυτό το στάδιο παρασκευής του πηκτώματος οδηγεί σε ποιοτικά κακή ηλεκτροφόρηση. Έπειτα, προστέθηκαν 12 μl χρωστικής SYBR® Safe DNA Gel Stain (400μl) (Cat NoS33102, Invitrogen), που επιτρέπει την παρατήρηση του DNA, γεγονός που προσφέρει το πλεονέκτημα της δυνατότητας ελέγχου της προόδου της ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια, η ρευστή αγαρόζη τοποθετήθηκε στο εκμαγείο. Το εκμαγείο είχε προετοιμαστεί κλείνοντας τις ανοικτές πλευρές του με χαρτοταινία και τοποθετώντας τα «χτένια», που χρησιμεύουν ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και στη δεξαμενή προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε κατά

την παρασκευή του, σε ποσότητα ώστε να υπερκαλύψει το πήκτωμα. Το πήκτωμα σχηματίζεται σε χρονικό διάστημα περίπου 30 λεπτών.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ηλεκτροφόρηση 5 μl από κάθε δείγμα αναμείχθηκε με 1μl διαλύματος «φόρτωσης» 10x Blue Juice Gel loading buffer (homemade). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις θέσεις υποδοχής με τη βοήθεια πιπέτας.

Ανάμεσα στα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν τοποθετήθηκε μάρτυρας (ladder) 100 bp DNA Ladder (50μg) (Cat No 15628-019, Invitrogen), προκειμένου να εξακριβωθεί αν τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν είχαν το επιθυμητό μέγεθος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε για 30 λεπτά με χορηγούμενη τάση 120 volt σε OWL D3-14, Electrophoresis tank (Thermo). Τέλος, πραγματοποιήθηκε παρατήρηση και φωτογράφιση του πηκτώματος στην τράπεζα υπεριώδους UST-20S-8E, UV-Transilluminator (Biostep).

2.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Ο καθαρισμός των παραγόμενων προϊόντων PCR είναι απαραίτητος πριν την αλληλούχησή τους, καθώς είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν αποτελεσματικά εκκινητές, dNTPs, ένζυμα και άλατα από το μίγμα της PCR αντίδρασης.

Ο καθαρισμός διενεργήθηκε με τη χρήση του ExoSap-IT συστήματος καθαρισμού προϊόντων PCR (Cat No 78201, Affymetric,). Τα αντιδραστήρια του ExoSAP-IT είναι κατάλληλα για PCR προϊόντα που κυμαίνονται μεταξύ μεγέθους από 100 bp έως 20 kb χωρίς σημαντική απώλεια προϊόντος κατά την απομάκρυνση εκκινητών και νουκλεοτιδίων. Μετά το τέλος της PCR το ExoSAP-IT, προστέθηκε κατευθείαν στην αντίδραση.

Συγκεκριμένα, 5μl από το προϊόν της PCR αντίδρασης αναμείχθηκαν με 2μl από το ExoSAP-IT αντιδραστήριο. Μετά την επώαση για 15 λεπτά στους 37°C για απομάκρυνση εκκινητών και νουκλεοτιδίων, το αντιδραστήριο απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 80°C για 15 λεπτά. Τα προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν απευθείας ή αποθηκεύθηκαν στους -20°C μέχρι την πραγματοποίηση της ανάλυσης της αλληλουχίας τους.

2.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

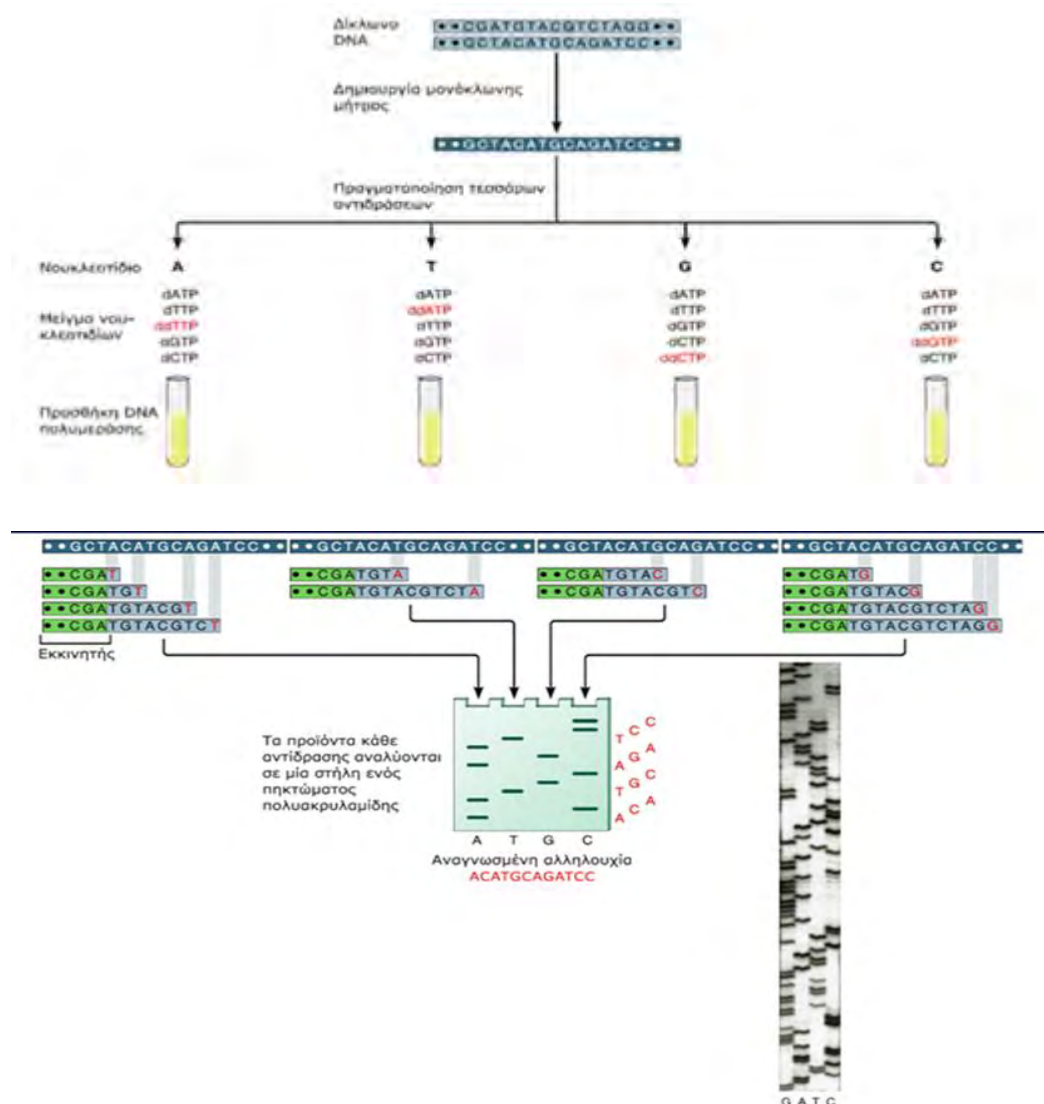
Το τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας είναι η αλληλούχηση του DNA. Αποτελεί μία διαδικασία προσδιορισμού της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (A, T, C και G) σε ένα τμήμα DNA.

Στην αλληλούχηση κατά Sanger, το DNA στόχος αντιγράφεται πολλές φορές, κάνοντας θραύσματα διαφορετικών μηκών. Η διαδικασία απαιτεί μονόκλωνο μόριο DNA, εκκινητή, DNA πολυμεράση, dNTPs και τροποποιημένα ddNTPs, τα οποία τερματίζουν την επιμήκυνση του κλώνου DNA. Αυτά τα νουκλεοτίδια τερματισμού της αλυσίδας στερούνται της ομάδας 3'-OH που απαιτείται για το σχηματισμό ενός

φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων, προκαλώντας την DNA πολυμεράση να παύσει την επέκταση του μορίου όταν ενσωματωθεί ένα τροποποιημένο ddNTP.

Τα ddNTPs μπορούν να επισημανθούν ραδιενεργώς ή με φθορίζουσα χρωστική, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσής τους σε αυτοματοποιημένα συστήματα προσδιορισμού αλληλουχίας. Τα φθορίζοντα νουκλεοτίδια "chainterminator" σημαίνουν τα άκρα των θραυσμάτων και επιτρέπουν την προσδιορισμό της αλληλουχίας. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 13) προβάλλονται τα στάδια της αλληλούχησης κατά Sanger.

Εικόνα 13: Στάδια της αλληλούχησης κατά Sanger [45]



Για την πραγματοποίηση της αλληλούχησης κατά Sanger, σε Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate no Barcode 10/pkg (Cat No N8010560, Applied Biosystems) τοποθετήθηκε 1μl από τα κεκαθαρωμένα PCR προϊόντα και τα αντιδαστήρια με όγκο όπως

περιγράφεται στον Πίνακα 7, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να φτάνει τα 10 μl. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή και εφαρμόστηκαν οι συνθήκες του Πίνακα 8 προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση κατά Sanger.

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια και ο προστιθέμενος όγκος για την πραγματοποίηση της αλληλούχησης κατά Sanger

Αντιδραστήρια	Προστιθέμενος όγκος (μl)
Ready Reaction Mix	1
5x Sequencing Buffer	1.5
Εκκινητής(5μM)	1
Νερό	5.5
Τελικός όγκος	9

Πίνακας 8: Συνθήκες αντίδρασης κατά Sanger

Αρχική αποδιάταξη (Denaturation):	96°	1 min
Αποδιάταξη (Denaturation):	96°	10 sec
Υβριδισμός (Annealing):	50°	5 sec
Επέκταση (Extension):	60°	4 min
Hold:	4°	Indefinite hold

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 25 κύκλους. Με το τέλος των κύκλων ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων με τα αντιδραστήρια που παραθέτονται στον Πίνακα 9 και ανάδευσή τους με ZX Classic Fisher brand vortex mixer (Fisher Scientific) για 30 λεπτά στις 2000 στροφές.

Έπειτα, τα δείγματα αλληλουχήθηκαν με τη χρήση γενετικού αναλυτή AB I3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, ThermoFisher) και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του παρογράμματος sequencing analysis 5.3.1(Applied Biosystems).

Πίνακας 9: Αντιδραστήρια καθαρισμού των παραγόμενων προϊόντων

Αντιδραστήριο	Προστιθέμενος όγκος (μl)
XTerminator Solution	10
SAM Solution	45

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η ενίσχυση του εξονίου 2 της *ANGPT-1* και η αλληλούχησή του, προκειμένου να εξακριβωθεί η ύπαρξη ή μη της μετάλλαξης p.A119S σε μεγάλο αριθμό ασθενών με κληρονομικό αγγειοίδημα.

Αρχικά, με σκοπό την ενίσχυση του εξονίου 2 με την χρήση της PCR, όπως περιγράφηκε ήδη, ήταν απαραίτητη η εύρεση συνθηκών για την διεξαγωγή της PCR καθώς δεν υπήρχαν στη διεθνή βιβλιογραφία. Έτσι έπειτα από πειραματισμό οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 6. Για την εύρεσή τους χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Tm calculator (ThermoFisher), όπου με την χρήση των εκκινητών υπολογίστηκε η θερμοκρασία υβριδισμού (Εικόνα 14).

Κατόπιν, για να εξακριβωθεί η καθαρότητα των προϊόντων της PCR, μέσω ηλεκτροφόρησης ανιχνεύθηκε το επιθυμητό προϊόν, το οποίο εμφανίζει μια ζώνη μεγέθους 340 bp μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2%, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15. Στην εικόνα παρατίθενται ορισμένα από τα δείγματα που ηλεκτροφορήθηκαν.

Η μετάλλαξη c.807G>T (p.A119S) ανιχνεύθηκε στο θετικό μάρτυρα, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στον αρνητικό μάρτυρα, όπως αναμενόταν. Η ανάλυση των 131 δειγμάτων U-HAE που εξετάστηκαν δεν ανέδειξε την παρουσία της μετάλλαξης σε κανέναν από τους υπό εξέταση ασθενείς.

Εικόνα 14: Υπολογισμός θερμοκρασιών της αντίδρασης PCR (www.thermofisher.com)

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'- CCAGCGGTGTCTTGT TTTTGT 20 nt: A=1.0 T=9.0 C=4.0 G=6.0 CG=50.00%

Primer#2: 5'- TGCTGAAATGTGCTCTGTGT 20 nt: A=3.0 T=8.0 C=3.0 G=6.0 CG=45.00%

Clear

4. PCR Conditions

Primer conc. 0.5 μM

Results

Export table data into Excel

ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol·cm)	Tm °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	CCAGCGGTGTCTT GTTTTGT	6121.0	177400.0	60.8	Primer#2	TGCTGAAATGTGC TCTGTGT	6154.1	184200.0	59.7	63.3

Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR



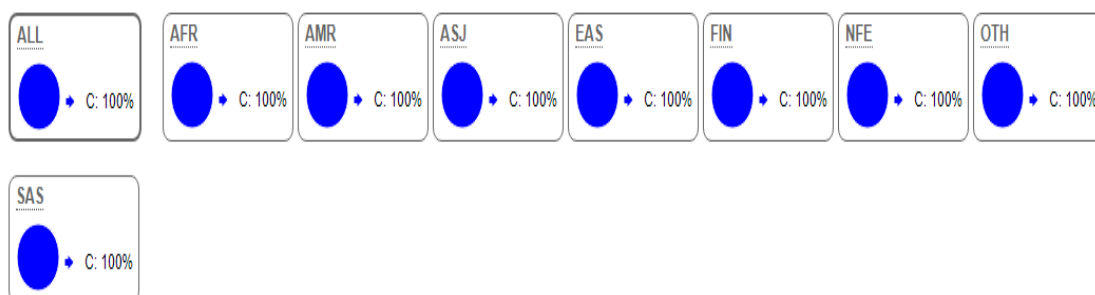
Η περιοχή που εμφανίζεται η μετάλλαξη είναι αρκετά συντηρημένη στους πληθυσμούς, όπως φαίνεται στην εικόνα 16 όπου με την χρήση της βάσης δεδομένων ensembl γίνεται εμφανές πως το αλληλόμορφο αγρίου τύπου εμφανίζεται σε όλους τους πληθυσμούς.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του θετικού (HAE 10250) και του αρνητικού (HAE 10249) μάρτυρα απεικονίζονται στις εικόνες 17 και 18, αντίστοιχα. Στην Εικόνα 17 γίνεται ορατή η ετερόζυγη μετάλλαξη ως διπλή κορυφή (G>T), στη θέση όπου στον αρνητικό μάρτυρα είναι εμφανής η παρουσία μόνο του νουκλεοτιδίου G (Εικόνα 18).

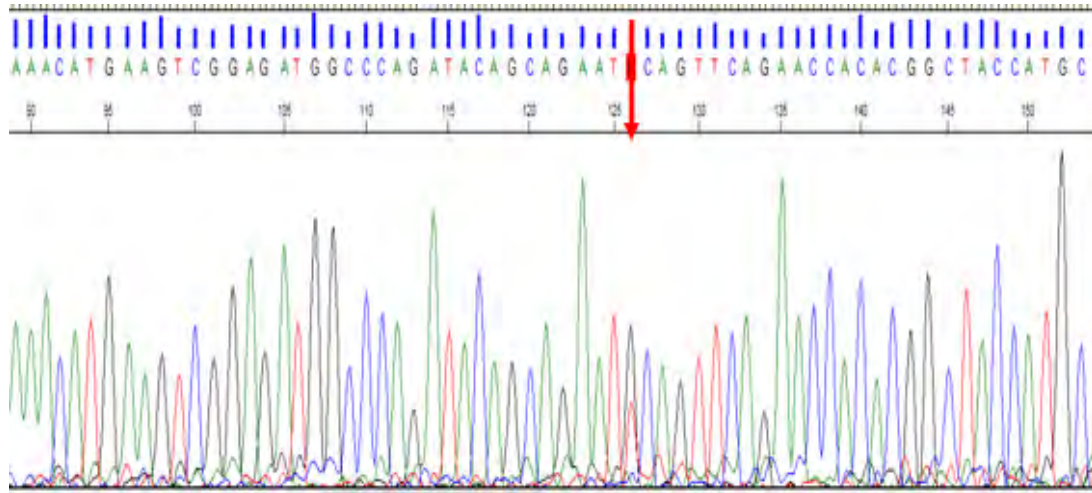
Εικόνα 16: Η συντήρηση του αλληλομόρφου αγρίου τύπου στους πληθυσμούς (www.ensembl.org)

Population genetics

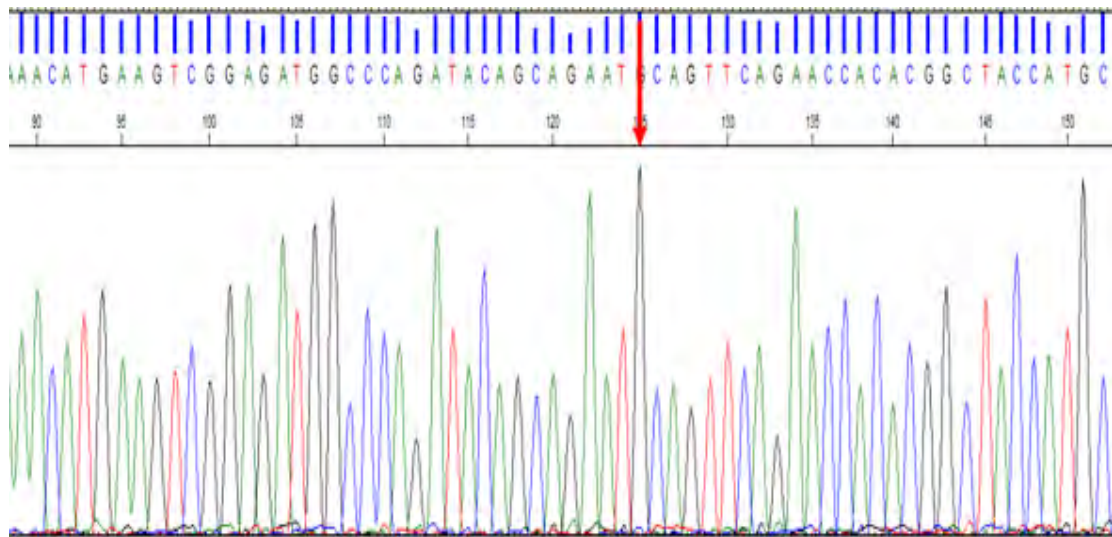
gnomAD exomes allele frequencies



Εικόνα 17: Ηλεκτροφερογράφημα ασθενούς (HAE 10250) ετερόζυγου για την μετάλλαξη p.A119S στο εξόνιο 2 της ANGPT-1



Εικόνα 18: Ηλεκτροφερογράφημα υγιούς (HAE 10249) συγγενικού ατόμου του ασθενούς για την μετάλλαξη p.A119S στο εξόνιο 2 της ANGPT-1



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή τη μελέτη, ερευνήσαμε την μετάλλαξη p.A119S σε δείγματα από οικογένειες με U-HAE. Η μετάλλαξη συσχετίζεται με τον κλινικό φαινότυπο, υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να αποτελεί μία από τις αιτίες εμφάνισης του U-HAE.

Το 80-85% των περιπτώσεων HAE οφείλεται στην ανεπάρκεια του C1-INH [46] και στην ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο FXII, καθώς πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η απελευθέρωση της βραδυκινίνης από την πλασμίνη διευκολύνεται από μεταλλάξεις στον F12 [47]. Η ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης p.A119S σε μία οικογένεια με U-HAE, υποδηλώνει ότι σε μία υποομάδα ασθενών το HAE μπορεί επίσης να προέρχεται από παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης της ANGPT-1 με τον μεμβρανικό υποδοχέα της TIE2.

Η ANGPT-1 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη συγκέντρωση της βραδυκινίνης στο πλάσμα μέσω παρεμβολής της στο μονοπάτι δράσης της βραδυκινίνης. Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Bafunno et al [7], οι ερευνητές υποθέτουν πως η μετάλλαξη p.A119S εμπλέκεται στην τροποποιημένη ρύθμιση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας, δημιουργώντας έτσι υποτροπιάζον αγγειοοίδημα, που είναι διαμεσολαβούμενο από την βραδυκινίνη, όπως και οι άλλοι τύποι HAE [43]. Τα αποτελέσματα από ζωικά μοντέλα και ασθενείς υποδηλώνουν ότι το μονοπάτι ANGPT-1-TIE2 σταθεροποιεί το αγγειακό ενδοθήλιο του αίματος και ρυθμίζει τη λειτουργία του φραγμού [48]-[51]. Πράγματι, η ANGPT-1 στοχεύει τους βασικούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στη διατήρηση της λειτουργίας του ενδοθηλιακού φραγμού, αναστέλλοντας τις επιδράσεις πολλαπλών παραγόντων ενίσχυσης της διαπερατότητας, συμπεριλαμβανομένου του VEGF [44] [52]. Σε ζωικά μοντέλα, η ANGPT-1 ρυθμίζει την προστασία των ενήλικων αγγείων από τη διαρροή πλάσματος, ιδιαίτερα στις φλεγμονώδεις ασθένειες [53].

Η ANGPT-1 δρα μέσω της δέσμευσής της στον TIE2, έναν υποδοχέα που εκφράζεται κυρίως σε αναπτυσσόμενα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα [54]. Σε αντίθεση με τους περισσότερους άλλους γνωστούς αυξητικούς παράγοντες, οι πολυμερείς δομές ANGPT-1 είναι κρίσιμες για την επαγωγή της ενεργοποίησης των TIE2, ενώ τα διμερή και τα μονομερή είναι λιγότερο ικανά να δεσμεύσουν τον υποδοχέα ενδοθηλιακών κυττάρων [55].

Η παραλλαγή ANGPT-1 που αναγνωρίστηκε στους ασθενείς με U-HAE βρίσκεται εντός του πρώτου τμήματος της σπειροειδούς περιοχής. Στα άτομα αυτά η ANGPT-1 παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα σχηματισμού πολυμερών και μειωμένη ικανότητα δέσμευσης στον TIE2 σε σύγκριση με την πρωτεΐνη που αναλύεται από το πλάσμα συγγενών τους χωρίς αγγειοοίδημα [7].

Άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο της ANGPT-1 που να έχουν συσχετιστεί προηγουμένως με ανθρώπινες ασθένειες δεν έχουν περιγραφεί. Ωστόσο, περισσότερες από 300 μεταλλάξεις του γονιδίου με άγνωστη κλινική σημασία, είναι καταχωρημένες στις βάσεις ExAc και Ensembl. Ωστόσο, το προϊόν του γονιδίου διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση καθώς η πλήρης ανεπάρκεια του δεν είναι βιώσιμη [56] και η υπερέκφρασή του προστατεύει από την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και άρα από το οίδημα [57].

Συνολικά, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι μια μερική εξασθένηση της ANGPT-1 σχετίζεται με αγγειοοίδημα και ότι οι παραλλαγές της μπορούν να αναγνωριστούν ως η τρίτη αιτία του HAE.

Στην μελέτη των Bafunno et al αναφέρεται πως μελέτες σε ζώα απέδειξαν έναν σημαντικό ρόλο της ANGPT-1 στην ενεργοποίηση των μαστοκυττάρων που θα μπορούσε να είναι υπεύθυνος για ένα θεραπευτικό αποτέλεσμα της σε ασθένειες με αναφυλαξία [58]. Δεν υπάρχουν στοιχεία πως η μετάλλαξη θα μπορούσε να τροποποιήσει αυτό το "θεραπευτικό" αποτέλεσμα της ANGPT-1, ωστόσο, τα πρόσφατα δεδομένα δείχνουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων και απελευθέρωσης κινίνης κατά τη διάρκεια της αναφυλαξίας και ενδεχομένως του αγγειοοιδήματος [59].

Κανένας από τους ασθενείς με την μετάλλαξη δεν είχε ποτέ αναφυλακτικές αντιδράσεις, αλλά δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι αυτή η μετάλλαξη μπορεί να βλάψει την δραστηριότητα της ANGPT-1 σε μαστοκύτταρα, επηρεάζοντας τον σχηματισμό αγγειοοιδήματος και / ή την αναφυλακτική αντίδραση.

Τα δεδομένα, υποδεικνύουν ότι η p.A119S οδηγεί σε μείωση της λειτουργίας της πρωτεΐνης που επηρεάζει την ικανότητα σχηματισμού πολυμερών. Ως αποτέλεσμα, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη έχει μειωμένη ικανότητα να δεσμεύει τον υποδοχέα της στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συμφωνούμε με το συμπέρασμα των Bafunno et al [7] πως βλάβη του ενδοθηλιακού συστήματος ANGPT-1-TIE2 μπορεί να λειτουργήσει ως νέα παθοφυσιολογική αιτία του U-HAE. Έτσι, οι φαρμακευτικοί παράγοντες που ενεργοποιούν την οδό υποδοχέα TIE2 που οδηγεί σε σταθεροποίηση αγγείων μπορεί να είναι χρήσιμοι για τη διατήρηση της λειτουργίας του ενδοθηλιακού φραγμού και για την παροχή προστασίας έναντι των αγγειακών διαρροών. Η αποτυχία μας να εντοπίσουμε τις μεταλλάξεις σε άλλες οικογένειες με U-HAE υποδηλώνει την ετερογένεια αυτής της μορφής αγγειοοιδήματος [7].

Γίνεται εμφανές, πως η ANGPT-1 αποτελεί γονίδιο ενδιαφέροντος για την εμφάνιση του U-HAE μέσω την εμπλοκής της στο μονοπάτι της βραδυκινίνης και πως η μετάλλαξη p.A119S θα μπορούσε να αποτελεί την αιτία εμφάνισης του U-HAE. Τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης κατέδειξαν πως στις συγκεκριμένες οικογένειες το U-HAE δεν οφείλεται σε αυτήν την βλάβη, ωστόσο δεν μπορούμε να αποκλείσουμε βλάβη σε άλλη περιοχή της αγγειοποιητίνης ή σε άλλα σημαντικά γονίδια του μονοπατιού της βραδυκινίνης, όπως το *PLG*.

Όπως προαναφέρθηκε, έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 300 μεταλλάξεις στο γονίδιο της ANGPT-1, σε περιοχές που επηρεάζουν είτε την δομή είτε την λειτουργία της, με αποτέλεσμα κάποιες από αυτές να χαρακτηρίζονται δυνητικά παθογονικές. Απαιτείται, λοιπόν, περαιτέρω διερεύνηση τόσο της ANGPT-1 αλλά και άλλων γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της βραδυκινίνης, ώστε να αναγνωρισθούν νέοι στόχοι για τη διάγνωση του κληρονομικού αγγειοοιδήματος.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί πως η συγκεκριμένη διπλωματική αποτελεί τμήμα μίας μεγαλύτερης ερευνητικής εργασίας που θα παρουσιαστεί στο Bradykinin Symposium / Angioedema School 2018 στο Βερολίνο. Ο τίτλος, οι συμμετέχοντες και η περίληψη αναφέρονται παρακάτω.

Frequency of PLG and ANGPT1 pathogenic variants in U-HAE and InH-AAE

Loules G, Zamanakou M, Csuka D, Psarros F, González-Quevedo T, Vatsiou S, Parsopoulou F, Speletas M, Bova M, Firinu D, Porebski G, Juchacz A, Glapatzi J, De Pasquale T, Zoli A, Radice A, Pizzimenti S, Zanichelli A, Manoussakis E, Konstantinou GN, Magerl M, Maurer M, Cicardi M, Farkas H, Germenis AE

Abstract

Objective. Very recently, two new pathogenic variants –the K330E of the PLG, and the A119S of the ANGPT1 gene– have been reported in patients with hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. We investigated the prevalence of these variants in a cohort of European patients with unknown hereditary angioedema (U-HAE) or idiopathic non-histaminergic acquired angioedema (InH-AAE).

Patients and Methods. 136 unrelated patients with U-HAE or InH-AAE (52 Hungarian, 33 Italian, 24 Spanish, 17 Greek, 8 Polish, 2 German) were enrolled in the study. The PLG gene was analyzed by targeted NGS (100% coverage of translated regions) while the ANGPT1 A119S variant was detected by Sanger sequencing.

Results. No carriers of ANGPT1 A119S variant were found among the examined patients. PLG K330E was detected in 4 (2.9%) unrelated probands (one homozygote). In two of these cases family segregation was performed. The segregation study of the first family revealed two healthy heterozygote daughters (>45 years) of the homozygote proband (mother) who was suffering severe angioedema since her age of 40 years (18 attacks/year when out of prophylactic treatment with good response to tranexamic acid). Among the 6 examined members of the other family, 3 patients suffering mainly tongue swellings and 2 healthy carriers were detected. The last of the examined members of this family, despite not carrying the PLG K330E variant, was presenting with attacks of eyelid swelling and/or abdominal pain. Other uncommon PLG variants (R89K, R253H, R490Q, R523W) were detected in our cohort the pathogenicity of which remains to be confirmed by family segregation studies.

Conclusion. The frequency of ANGPT1 A119S variant seems to be very low among patients with hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. The PLG K330E variant appears with a frequency of about 3% in this population but with incomplete penetrance.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. Cicardi M et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema:consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy*. 2014 May;69(5):602-16.
- [2]. Wu MA et al. Angioedema Phenotypes: Disease Expression and Classification. *Clin Rev. Allergy Immunol*. 2016 Oct;51(2):162-9.
- [3]. Mansi M et al. Presentation,diagnosis and treatment of angioedema without wheals:a retrospective analysis of a cohort of 1058 patients. *J Int Med* 2015 277 Issue 5 p.585–593.
- [4]. Longhurst H, Cicardi M. Hereditaryangiooedema. *Lancet* 2012;379:474–481.
- [5]. Bork K et al. H.Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet* 2000;356:213–217.
- [6]. Cichon S et al. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet* 2006;79:1098–1104.
- [7]. V. Bafunno et al. Mutation of Angiopoietin-1 Gene Associates with a New Type of Hereditary Angioedema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2017,February.
- [8]. Frigas E, Miguel P. Idiopathic recurrent angioedema. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26:739–751.
- [9]. Gower RG et al. Hereditary angioedema caused by c1-esterase inhibitor deficiency:a literature-based analysis and clinical commentary on prophylaxis treatment strategies. *WAO Journal* February 2011 Supplement.
- [10]. Kemp JG et al. Variability of prodromal signs and symptoms associated with hereditaryangioedemaattacks:a literature review. *Allergy Asthma Proc*. 2009 Sep-Oct;30:493-9.
- [11]. Baker JD. Challenges of hereditary angioedema in female patients. *The Female Patient*vol 37 February 2012.
- [12]. Brickman CM, Tsokos GC, Balow JE. Immunoregulatory disorders associated with hereditary angioedema. Clinical manifestations of autoimmune disease. *J Allergy ClinImmunol* 1986;77: 749-57.
- [13]. Longhurst H, Cicardi M. Hereditary angio-oedema. *Lancet*. 2012 Feb4;379(9814):474-81.
- [14]. Epstein T, Bernstein J. Current and emerging management options for hereditary angioedema in the US. *Drugs* 2008; 68: 2561-73.2.
- [15]. Cugno M et al. Bradykinin and the pathophysiology of

- angioedema. *Int Immunopharmacol*. 2003;3:311–7.
- [16]. Bork K et al. Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *Am J Med* 2006;119:267–27.
- [17]. Bork K et al. Hereditary angioedema caused by missense mutations in the factor XII gene: clinical features, trigger factors, and therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jul;124(1):129-34.
- [18]. Bouillet L et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: clinical characteristics and treatment response with plasma-derived human C1 inhibitor concentrate (Berinert®) in a French cohort. *Eur J Dermatol*. 2017 Apr1;27(2):155-159.
- [19]. Forster T, Muller CR, Oldenburg J. Expression Analysis of C1-Inhibitor Mutants Confirms Causality of Missense Mutations for Hereditary Angioedema. *36th Hemophilia Symposium Hamburg* 2005 pp:220-223.
- [20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/284>
- [21]. Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res*. 2006 Apr 28;98(8):1014-23.
- [22]. Zhang EG et al. The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placentae. *Mol Med*. 2001 Sep;7(9):624-35.
- [23]. Soleti R, Martinez MC. Sonic Hedgehog on microparticles and neovascularization. *Vitam Horm*. 2012;88:395-438.
- [24]. Rubio RG, Adamis AP. Ocular Angiogenesis: Vascular Endothelial Growth Factor and Other Factors. *Dev Ophthalmol*. 2016;55:28-37.
- [25]. Tsuzuki T et al. Divergent regulation of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and vascular endothelial growth factor by hypoxia and female sex steroids in human endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 May;168(1):95-101.
- [26]. Davis S et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1161-9.
- [27]. Huang H et al. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug;10(8):575-85.
- [28]. Teichert M et al. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nat Commun*. 2017 Jul 18;8:16106.
- [29]. Powell LC et al. Cardiac kallikrein-kinin system is upregulated in chronic volume overload and mediates an inflammatory induced collagen loss. *PLoS One*. 2012;7(6):e40110).
- [30]. Goliás Ch et al. The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin. *Hippokratia*. 2007 Jul;11(3):124-8.
- [31]. Couture R et al. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2001 Oct 19;429(1-3):161-76.

- [32]. Wei CC et al. Cardiac kallikrein-kinin system is upregulated in chronic volume overload and mediates an inflammatory induced collagen loss. *PLoSOne*. 2012;7(6):e40110.
- [33]. Bengtson SH et al. Kinin receptor expression during *Staphylococcus aureus* infection. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):2055-63. Epub 2006 May 30.
- [34]. Davis S et al. Angiotensins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nature Structural Biology*, 2003, February, 38-44.
- [35]. Zuraw BL. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: Four types and counting. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Mar;141(3):884-885.
- [36]. Parikh SM. Angiotensins and Tie2 in vascular inflammation. *Curr Opin Hematol*. 2017 Sep;24(5):432-438.
- [37]. Bork K et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: *clinical symptoms and course*. *Am J Med* 2007;120:987–992.
- [38]. Madeddu P et al. Regulation of bradykinin B2-receptor expression by oestrogen. *British Journal of Pharmacology* 1997 121, 1763-69.
- [39]. Nussberger J et al. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* June 6, 1998, p 1693-1697.
- [40]. Riedl M, Gower RG, Chrvala CA. Current medical management of hereditary angioedema: results from a large survey of US physicians. *Ann Allergy Asthma Immunology* 2011;106:316-322 1998;351:1693–97.
- [41]. Martin L. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor gene in a family with affected women and men is associated with the p.Thr328Lys mutation in the F12 gene. *J Allergy Clin Immunology* 2007;120:975-7.
- [42]. Bork K et al. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy* August 2017 p 1-9.
- [43]. Baffert F et al. Angiotensin-1 decreases plasma leakage by reducing number and size of endothelial gaps in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 290: H107–H118.
- [44]. JHO D et al. Angiotensin-1 opposes VEGF-induced increase in endothelial permeability by inhibiting TRPC1-dependent Ca² influx. *Circulation Research* June 24, 2005.
- [45]. Watson, J.D. Recombinant DNA: Genes and Genomes: A Short Course, third edition, 2007.
- [46]. Bork k et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Allergy Clin North Am* 2013;33:457-470.
- [47]. de Maat S et al. Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *J Allergy Clin Immunology* 2016;138:1414-1423.
- [48]. Thurston G et al. Leakage - resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiotensin-1. *Science* 1999;286:2511–4.

- [49]. Jeansson M et al. Angiopoietin- 1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *J Clin Invest* 2011;121:2278-89.
- [50]. Ghosh CC et al. Impaired function of the tie-2 receptor contributes to vascular leakage and lethality in anthrax. *Proc Natl AcadSci U S A.* 2012; 109:10024-9.
- [51]. Witzenbichler B et al. Protective role of angiopoietin-1 in endotoxic shock. *Circulation* 2005;111:97-105.
- [52]. Gavard J, Patel V, Gutkind JS. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell.* 2008;14:25-36.
- [53]. Jiang H et al. Angiopoietin-1 ameliorates inflammation-induced vascular leakage and improves functional impairment in a rat model of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol* 2014;261:245-57.
- [54]. Augustin HG et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:165-77.
- [55]. Kim KT et al. Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2. *J Biol Chem.* 2005;280:20126-31.
- [56]. Suri C et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996;87:1171-80.
- [57]. Thurston G et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med.* 2000;6:460-3.
- [58]. Yao JH et al. Angiopoietin1 inhibits mast cell activation and protects against anaphylaxis. *PLoS One* 2014;9:e89148.
- [59]. Sala-Cunill A et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *J Allergy ClinImmunol.* 2015;135:1031-43.