



## ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΥ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑΤΟΣ

ΣΟΦΙΑ ΒΑΤΣΙΟΥ, M.Sc.

Μοριακή Βιολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2021



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2<sup>ος</sup> Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

©2021 Βάτσιου Σοφία

*«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν. 5343/1932)»*

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

<b>1<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>ΓΕΡΜΕΝΗΣ Ε. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ</b> Ομότιμος Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας (επιβλέπων)
<b>2<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>ΣΠΕΛΕΤΑΣ ΜΑΤΘΑΙΟΣ</b> Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας
<b>3<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ ΕΥΘΥΜΙΑ</b> Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας
<b>4<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>ΜΠΟΓΔΑΝΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ</b> Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων
<b>5<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ</b> Καθηγητής Πνευμονολογίας
<b>6<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΙΤΣΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ</b> Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας
<b>7<sup>ος</sup> Εξεταστής</b>	<b>ΚΑΤΣΙΑΡΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ</b> Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογίας-Ρευματολογίας

*Στους γονείς μου*

*Στον Γιώργο μου*

# ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΥ ΑΓΓΕΙΟΟΙΔΗΜΑΤΟΣ

**ΒΑΤΣΙΟΥ ΣΟΦΙΑ**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2021

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Ε. ΓΕΡΜΕΝΗΣ**, Ομότιμος Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας (επιβλέπων), Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **ΜΑΤΘΑΙΟΣ ΣΠΕΛΕΤΑΣ**, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **ΕΥΘΥΜΙΑ ΠΕΤΕΙΝΑΚΗ**, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Κλινικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό Σημείωμα .....	7
Πρόλογος .....	13
Συντομογραφίες.....	15
Περίληψη .....	18
Abstract.....	19
Γενικό Μέρος .....	20
1. Εισαγωγή.....	21
2. C1-INH-HAE .....	24
2.1. Γενετική και Παθοφυσιολογία του C1-INH-HAE .....	24
2.2. Ιντρονικές Μεταλλάξεις στο Γονίδιο <i>SERPING1</i> .....	26
2.3. Επιπτώσεις των Ιντρονικών Μεταλλάξεων.....	31
3. FXII-HAE.....	35
3.1. Γενετική του FXII-HAE.....	35
3.2. Παθοφυσιολογία του FXII-HAE .....	39
Ειδικό Μέρος.....	42
4. Ασθενείς και Υλικά της Μελέτης.....	43
4.1. Ανίχνευση Ιντρονικών Μεταλλάξεων στο Γονίδιο <i>SERPING1</i> .....	43
4.2. Ανίχνευση Μεταλλάξεων στο Γονίδιο <i>F12</i> .....	43
5. Μεθοδολογία Έρευνας.....	45
5.1. Ανίχνευση Ιντρονικών Μεταλλάξεων <i>SERPING1</i> .....	45
5.1.1. Αλληλούχηση με NGS.....	45
5.1.2. Αλληλούχηση κατά Sanger.....	47
5.1.3. Λειτουργική Μελέτη των Μεταλλάξεων.....	48
5.1.4. Χαρακτηρισμός των Μεταλλάξεων.....	50
5.2. Ανίχνευση Μεταλλάξεων στο Γονίδιο <i>F12</i> .....	50
5.2.1. Αλληλούχηση με NGS.....	50
5.2.2. Αλληλούχηση κατά Sanger.....	52
6. Αποτελέσματα.....	53
6.1. Ανίχνευση Ιντρονικών Μεταλλάξεων στο Γονίδιο <i>SERPING1</i> .....	53
6.2. Ανίχνευση Μεταλλάξεων στο Γονίδιο <i>F12</i> .....	69

7. Συζήτηση .....	83
7.1. Ανίχνευση Ιντρονικών Μεταλλάξεων στο Γονίδιο <i>SERPING1</i> .....	83
7.2. Ανίχνευση Μεταλλάξεων στο Γονίδιο <i>F12</i> .....	95
7.3. Συμπεράσματα .....	101
Βιβλιογραφία .....	104
Παραρτήματα .....	117
Δημοσιεύσεις .....	124

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

---

Όνομα: Σοφία Βάτσιου  
Ημερομηνία Γέννησης: 13/06/1992  
E-mail : vtsofie@gmail.com

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

---

2017-2021 Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας  
*Υποψήφια Διδακτορική Φοιτήτρια - Υπότροφος ΙΚΥ*

2015-2016 Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας  
*Μεταπτυχιακό πρόγραμμα: Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής*

2010-2015 Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής,

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

---

2019-σήμερα CeMIA S.A. (Cellular and Molecular Immunological Applications)  
*Βιολόγος*

2017-2018 ΟΑΕΔ-ΕΠΑΣ-Βοηθοί Νοσηλευτών  
*Καθηγήτρια Βιολογίας*

2015-2019 CeMIA S.A. (Cellular and Molecular Immunological Applications)  
*Βοηθός Εργαστηρίου (Πρακτική άσκηση)*

2013-2014 Εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Αλεξανδρούπολης  
*Βοηθός Εργαστηρίου (Πρακτική άσκηση)*

### ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

---

- **Μοριακή Βιολογία**
  - Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση Standard Operating Procedures (SOPs)
  - Genome DNA extraction
  - RNA extraction
  - cDNA synthesis
  - DNA purification
  - Conventional PCR and Real Time PCR analysis
  - Design of primers for use in PCR
  - Gel electrophoresis (agarose and SDS-PAGE)
  - Sanger sequencing
  - Next Generation Sequencing (Exome, 16S Metagenomics, Ampliseq)
  - HLA typing (SBT, NGS)
  - Fragment Analysis
  - Sanger result analysis



- NGS result analysis
- Western blot
- MLPA
- Long Range PCR
- **Ανοσολογικές Τεχνικές**
  - RIA
  - IRMA
  - RAST test
- **Έλεγχος ποιότητας**
  - ISO 9001:2015
  - ISO 17025 accreditation
  - European Federation for Immunogenetics (EFI) accreditation

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

---

1. Στυλιανάκης Ε, Καντεράκης Α, Λατσούδη Ε, Μαυρουδή Ε, Γεωργοπούλου Α, Γόντικα Ι, Μπάτσαλη Α, Φραγκιαδάκη Ε, Γκιόκα Β, **Βάτσιου Σ**, Ζαμανάκου Μ, Παπαδάκη Ε. Η σημασία των δημόσιων τραπεζών ομφαλοπλακουντιακού αίματος για την κάλυψη πληθυσμών με γενετική ποικιλομορφία σε περιπτώσεις αλλογενούς μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. *31<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο*, 29-31/10/2020, Αθήνα.
2. Stylianakis E, Kanterakis A, Mavroudi I, Georgopoulou A, Gontika G, Batsali A, Fragiadaki I, Zamanakou M, **Vatsiou S**, Papadaki AH. The importance of the regional public cord blood bank of Crete for allogeneic access of the Cretan ethnic minority. *EHA 2020*, 11-14/06/2020, Φρανκφούρτη.
3. **Vatsiou S**, Zamanakou M, Loules G, Parsopoulou F, Germenis AE. A deep intronic *SERPING1* variant associated with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency (C1-INH-HAE). *11th C1 Inhibitor Deficiency and Angioedema Workshop*, 23-26/05/2019, Βουδαπέστη.
4. **Vatsiou S**, Zamanakou M, Parsopoulou F, Loules G, Germenis AE. The silo effect in the annotation of *SERPING1* variation. *11th C1 Inhibitor Deficiency and Angioedema Workshop*, 23-26/05/2019, Βουδαπέστη.
5. **Βάτσιου Σ**. Γενετική του κληρονομικού αγγειοιδήματος. *13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας*, 11-14/04/2019, Θεσσαλονίκη.
6. **Βάτσιου Σ**, Λουλές Γ, Ζαμανάκου Μ, Παρσοπούλου Φ, Ψαρρός Φ, Csuka D, Porebski G, Moldovan D, Magerl M, Maurer M, Σπελέτας Μ, Farkas, Γερμενής ΑΕ. Ανίχνευση Μεταλλάξεων στο Γονίδιο *F12* σε Ασθενείς με Κληρονομικό Αγγειοίδημα με τη Χρήση της Αλληλούχησης Νέας Γενεάς. *Συνέδριο Αλλεργιολογίας: Το αλλεργικό παιδί και οι εξελίξεις*, 7-10/02/2019, Αθήνα.
7. Παρσοπούλου Φ, Λουλές Γ, Ζαμανάκου Μ, Csuka D, Ψαρρός Φ, González-Quevedo T, **Βάτσιου Σ**, Σπελέτας Μ, Bona M, Firinu D, Porebski G, Juchacz A, Γλαπατζή Ι, De Pasquale T, Zoli A, Radice A, Pizzimenti S, Zanichelli A, Μανουσάκης Ε, Κωνσταντίνου ΓΝ, Μακρής Μ, Συρίγου Α, Σινανιώτης Α, Magerl M, Maurer M, Cicardi M, Farkas H, Γερμενής ΑΕ. Συχνότητα των Παθογονικών Μεταλλάξεων *PLG K330E* και *ANGPT1 A119S* σε Ασθενείς με Κληρονομικό Αγγειοίδημα και Φυσιολογικό C1-αναστολέα (nC1-INH-HAE). *Συνέδριο Αλλεργιολογίας: Το αλλεργικό παιδί και οι εξελίξεις*, 7-10/02/2019, Αθήνα.
8. **Vatsiou S**, Loules G, Zamanakou M, Parsopoulou F, Psarros F, Csuka D, Porebski G, Moldovan D,

- Magerl M, Maurer M, Speletas M, Farkas H, Germenis AE. Next generation sequencing panel for the detection of *F12* mutations in patients with hereditary angioedema. *69<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας*, 23-25/11/2018, Λάρισα.
9. Parsopoulou F, Loules G, Zamanakou M, **Vatsiou S**, Psarros F, Stefanaki T, Porebski G, Valerieva A, Moldovan D, Magerl M, Speletas M, Farkas H, Germenis AE. Routine *SERPING1* genotyping by targeted NGS: New pathogenic variants. *69<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας*, 23-25/11/2018, Λάρισα.
  10. 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, PizzimenG S, Zanichelli A, Manoussakis E, Konstantinou GN, Magerl M, Maurer M, Cicardi M, Farkas H, Germenis AE. Frequency of *PLG* and *ANGPT1* pathogenic variants in U-HAE and InH-AAE. *5th Bradykinin Symposium*, 5-7/09/2018, Βερολίνο.
  11. Λουλές Γ, Ζαμανάκου Μ, Ψαρρός Φ, **Βάτσιου Σ**, Παρσοπούλου Φ, Σπελέτας Μ, Κουτσοστάθης Ν, Στεφανάκη Ε, Χρυσολάκης Σ, Σινανιώτης Α, Μαυρολέων Γ, Γαβριλιάδης Σ, Κουταλιώνης Γ, Μήκος Ν, Κομπότη Ε, Γερμενής Α. Αλληλούχηση Νέας Γενεάς για την γονοτύπηση ασθενών με κληρονομικό αγγειοοίδημα από ανεπάρκεια της C1-Εστεράσης (C1-INH-HAE). *12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Αλλεργιολογίας και Κλινικής Ανοσολογίας «Εξερευνώντας το σύμπαν της αλλεργίας»*, 29/03-1/04/2018, Αθήνα.
  12. Μπάρμπα ΕΜ, Τσαρτσaráκης Α, **Βάτσιου Σ**, Θεοχάρης Θ, Γιαμουστάρης Α, Ζησιμόπουλος Α. Προσδιορισμός των τιμών της Παραθορμόνης με ραδιοανοσομετρική μέθοδο, στον ορό ασθενών με αδενώματα παραθυρεοειδών. Συσχέτιση με το σπινθηρογράφημα δια τεχνητού 99m Tc-MIBI . Ποιος ο ρόλος της p-γλυκοπρωτεΐνης; *37<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών*, 21-23/05/2015, Βόλος.
  13. **Βάτσιου Σ**, Τσαρτσaráκης Α, Μπάρμπα ΕΜ, Καραθάνος Ε, Νίνος Ι, Γιαμουστάρης Α, Ζησιμόπουλος Α. Προσδιορισμός της διακύμανσης των τιμών της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) του ορού με την ανοσοραδιομετρική μέθοδο IRMA στο χειρισμό των ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς με την ενδοφλέβια χορήγηση Recombinant TSH. *37<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών*, 21-23/05/2015, Βόλος.
  14. Σωτηροπούλου Ρ, Μάρκου Μ, **Βάτσιου Σ**, Μπέντη Δ, Δαρούση Σ, Ράντος Β, Καφκούτσου ΑΛ, Γιαμουστάρης Α, Τσαρτσaráκης Α, Ζησιμόπουλος Α. Μελέτη της προκαλσιτονίνης του ορού ως δείκτη φλεγμονής σε παιδιά με πνευμονοφρίτιδα. Σύγκριση με τη CRP και το στατικό σπινθηρογράφημα νεφρών 99m Tc-DMSA. *37<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών*, 21-23/05/2015, Βόλος.
  15. Ψωμιάδου Α, Τσαρτσaráκης Α, Μπαλόκα Λ, **Βάτσιου Σ**, Φασουλή ΕΣ, Μπάρμπα ΕΜ, Τσαϊρίδης Δ, Γιαμουστάρης Α, Καραθάνος Ε, Ζησιμόπουλος Α. Ο ρόλος της φετουίνης ως προγνωστικός παράγοντας στην παρακολούθηση ασθενών με στεφανιαία νόσο, σε συσχέτιση με σπινθηρογραφικό έλεγχο της καρδιάς. *36<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών*, 8-10/05/2014, Ιωάννινα.
  16. Βελισσαράτου Μ, Τσαρτσaráκης Α, Φασουλή ΕΣ, Μπάρμπα ΕΜ, Μπαλόκα Λ, **Βάτσιου Σ**, Γιαμουστάρης Α, Ζησιμόπουλος Α. Εκτίμηση των τιμών της κοπεπτίνης ως προγνωστικού δείκτη σε ασθενείς με υπαραχνοειδή αιμορραγία που νοσηλεύονται στη ΜΕΘ. *36<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών*, 8-10/05/2014, Ιωάννινα.
  17. Βελισσαράτου Μ, Τσαρτσaráκης Α, Μπαλόκα Λ, **Βάτσιου Σ**, Καραθάνος Ε, Θωμαΐδου Α, Τσαλταμπασίδου Μ, Ζησιμόπουλος Α. Εκτίμηση των τιμών της φετουίνης του ορού ως προγνωστικό παράγοντα στην παρακολούθηση ασθενών με στεφανιαία νόσο, σε συσχέτιση με τον

σπινθηρογραφικό έλεγχο της καρδιάς. 12<sup>ο</sup> Συνέδριο Πυρηνικής Ιατρικής, 30/05-1/06/2014, Ιωάννινα.

## ΣΥΝΕΔΡΙΑ-ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

---

1. ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025, απαιτήσεις για εργαστήρια δοκιμών διακριβώσεων, 9-11/12/2020, Λάρισα.
2. Πρότυπα EFI v.8 και διαδικασία εφαρμογής, 9-11/11/2020, Λάρισα.
3. Πρότυπα ISO 9001:2015 and ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025 και απαιτήσεις, 25/05-3/06/2020, Λάρισα.
4. Πρότυπο ΕΛΟΤ ISO/IEC 17025 και απαιτήσεις, 12/07/2019, Λάρισα.
5. Ion world tour 2017-Thermo Fisher Scientific-Antisel, 21/10/2017, Αθήνα.
6. Πρότυπο ISO 9001:2015 και νέες απαιτήσεις, 4/04/2017, Λάρισα.
7. NXTtype workflow and Type Stream analysis for HLA typing using NGS technology, One Lambda/Antisel SA, 24-28/10/2016, Λάρισα.
8. Πρότυπο ISO 9001:2015 και νέες απαιτήσεις, 11/04/2016, Λάρισα.
9. Εφαρμογές και χρήση του Ion Torrent PGM και ροή εργασιών Ion AmpliSeq, 13-15/10/2015, Λάρισα.
10. Η ιατρική στη παγκοσμιοποίηση: Ταξιδιωματική και Διεθνής Ιατρική, 28/03/2015, Λάρισα.
11. 65<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 28-30/10/2014, Θεσσαλονίκη.
12. 1<sup>ο</sup> Συνέδριο Εκπαίδευσης και Έρευνας της Ιατρικής του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης, 28-30/03/2014, Αλεξανδρούπολη.
13. Sexually Transmitted Viral Infection: Current Diagnostic and Therapeutic Approaches, 15-17/10/2013, Αλεξανδρούπολη.
14. Νοητική Αναπηρία-Γενετικά Σύνδρομα: Εκπαιδευτικές και Αναπτυξιακές Προσεγγίσεις, 19/03/2011, Αλεξανδρούπολη.
15. 61<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 15-17/10/2010, Αλεξανδρούπολη.

## ΒΡΑΒΕΙΑ

---

### **2<sup>ο</sup> Βραβείο προφορικής παρουσίασης στο Συνέδριο Αλλεργιολογίας: Το αλλεργικό παιδί και οι εξελίξεις**

Παρσοπούλου Φ, Λουλές Γ, Ζαμανάκου Μ, Csuka D, Ψαρρός Φ, González-Quevedo T, **Βάτσιου Σ**, Σπελέτας Μ, Bova M, Firinu D, Porebski G, Juchacz A, Glapatzi I, De Pasquale T, Zoli A, Radice A, Pizzimenti S, Zanichelli A, Μανουσάκης Ε, Κωνσταντίνου ΓΝ, Μακρής Μ, Siriggou A, Sinaniotis A, Magerl M, Maurer M, Cicardi M, Farkas H, Γερμενής ΑΕ. Συχνότητα των Παθογονικών Μεταλλάξεων *PLG K330E* και *ANGPT1 A119S* σε Ασθενείς με Κληρονομικό Αγγειοοίδημα και Φυσιολογικό C1-αναστολέα (nl-C1INH-HAE), *Συνέδριο Αλλεργιολογίας: Το αλλεργικό παιδί και οι εξελίξεις*, 7-10/02/2019, Αθήνα.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

---

1. Zamanakou M, **Vatsiou S**, Stokidis S, Fortis SP, Germenis AE. Identification of two novel alleles, HLA-A\*02:01:193 and -DQA1\*02:17, in Greek individuals. *HLA*. 2021. doi: 10.1111/tan.14229.

2. Batsali A, Latsoudis H, **Vatsiou S**, Stylianakis E, Papadaki HA. Two novel HLA-C alleles, HLA-C\*15:228 and -C\*04:434, detected in inhabitants from the island of Crete. *HLA*. 2020. doi: 10.1111/tan.14155.
3. Xagorari A, Zamanakou M, **Vatsiou S**, Germenis AE, Sotiropoulos D. Detection of two novel alleles, HLA-A\*02:943 and -B\*51:104:02, in Greek cord blood units. *HLA*. 2020. doi: 10.1111/tan.14138.
4. Georgopoulou A, Latsoudis H, **Vatsiou S**, Stylianakis E, Papadaki HA. Detection of the novel HLA-DQB1\*03:439 variant in an inhabitant from the island of Crete. *HLA*. 2020. doi: 10.1111/tan.14125.
5. Loules G, Parsopoulou F, Zamanakou M, Csuka D, Bova M, González-Quevedo T, Psarros F, Porebski G, Speletas M, Firinu D, Del Giacco S, Suffritti C, Makris M, **Vatsiou S**, Zanichelli A, Farkas H, Germenis AE. Deciphering the Genetics of Primary Angioedema with Normal Levels of C1 Inhibitor. *J Clin Med*. 2020; 9: E3402.
6. Germenis AE, **Vatsiou S**, Csuka D, Zamanakou M, Farkas H. Deep Intronic *SERPING1* Gene Variants: Ending One Odyssey and Starting Another? *J Clin Immunol*. 2020. doi: 10.1007/s10875-020-00887-3.
7. **Vatsiou S**, Zamanakou M, Loules G, Psarros F, Parsopoulou F, Csuka D, Valerieva A, Staevska M, Porebski G, Obtulowicz K, Magerl M, Maurer M, Speletas M, Farkas H, Germenis AE. A novel deep intronic *SERPING1* variant as a cause of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Allergol Int*. 2020. pii: S1323-8930(20)30003-4.
8. **Vatsiou S**, Zamanakou M, Loules G, González-Quevedo T, Porębski G, Juchacz A, Bova M, Suffritti C, Firinu D, Csuka D, Manousakis E, Valerieva A, Staevska M, Magerl M, Farkas H, Germenis AE. Aspects of hereditary angioedema genotyping in the era of NGS: The case of *F12* gene. *Alergia Astma Immunologia*. 2018, 23: 205-210.
9. Loules G, Zamanakou M, Parsopoulou F, **Vatsiou S**, Psarros F, Csuka D, Porebski G, Obtulowicz K, Valerieva A, Staevska M, López-Lera A, López-Trascasa M, Moldovan D, Magerl M, Maurer M, Speletas M, Farkas H, Germenis AE. Targeted next-generation sequencing for the molecular diagnosis of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Gene*. 2018; 667: 76-82.

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

---

1. **Vatsiou S**, Zamanakou M, Psarros F, Speletas M, Loules G, Parsopoulou F, Valerieva A, Farkas H, Germenis AE. A deep intronic *SERPING1* variant associated with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency (C1-INH-HAE). *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2019; 15(Suppl 4): 45.
2. **Vatsiou S**, Zamanakou M, Parsopoulou F, Loules G, Germenis AE. The silo effect in the annotation of *SERPING1* variation. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2019; 15(Suppl 4): 45.

#### ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

---

2018-2021 Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)

#### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

---

- Αγγλικά, Certificate of Proficiency, Michigan University and IELTS Degree (Academic) with overall grade of 7.0
- Γερμανικά, B1 Degree, Goethe Institut

## ΓΝΩΣΕΙΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

---

- Άριστη γνώση στη χρήση υπολογιστή (Windows, Microsoft Office, Photoshop, Adobe Illustrator, internet)
- European Computer Driving License, ECDL
- Γνώσεις προγραμματισμού στις γλώσσες: Perl, C και C ++

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το κληρονομικό αγγειοοίδημα είναι μια σπάνια, δυνητικά απειλητική για τη ζωή γενετική διαταραχή που εκδηλώνεται με επαναλαμβανόμενα επεισόδια οιδήματος, είτε υποδόρια είτε στους βλεννογόνους. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται οίδημα στα χέρια, στα πόδια, στο πρόσωπο, στο δέρμα, στις γενετικές περιοχές, αλλά και στα εσωτερικά όργανα και στο αναπνευστικό σύστημα. Η νόσος αυτή μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο, με την πρόκληση ασφυξίας μετά την εμφάνιση λαρυγγικού οιδήματος, το οποίο εμφανίζεται στο 50% των ασθενών.

Η παθογένεια της νόσου έχει συσχετιστεί μέχρι σήμερα με την ύπαρξη μεταλλάξεων σε επτά γονίδια. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1*, το οποίο κωδικοποιεί τον αναστολέα της C1 εστεράσης, οδηγούν σε λειτουργική ή ποσοτική ανεπάρκεια του C1-INH και επομένως σε C1-INH-HAE. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του *F12*, το οποίο κωδικοποιεί τον παράγοντα πήξης XII, οδηγούν στο FXII-HAE. Ο τύπος αυτός αγγειοοιδήματος εκδηλώνεται με παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά με το C1-INH-HAE, αλλά με φυσιολογικά επίπεδα λειτουργικής C1-INH στο πλάσμα. Επιπρόσθετα, έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις στα γονίδια *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF* και *HS3OST6*, οι οποίες οδηγούν σε κληρονομικό αγγειοοίδημα με φυσιολογικό αναστολέα C1-εστεράσης.

Το κληρονομικό αγγειοοίδημα με ανεπάρκεια του αναστολέα C1-εστεράσης χαρακτηρίζεται από μεγάλη αλληλική ετερογένεια, καθώς συσχετίζεται με περισσότερες από 700 μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1*. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι διάσπαρτες στα οκτώ εξώνια και τα όρια εξωνίων-ιντρονίων του γονιδίου *SERPING1*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι σε περίπου 9,2% των ασθενών με C1-INH-HAE η παθογόνος μετάλλαξη δεν μπορεί να ανιχνευθεί με την τυπική γενετική εξέταση, η οποία περιορίζεται στην αλληλούχηση των εξωνίων και των ορίων εξωνίων-ιντρονίων του γονιδίου *SERPING1*. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι, σε μερικούς ασθενείς, η αιτιολογική μετάλλαξη η οποία τροποποιεί την έκφραση του C1-INH μπορεί να βρίσκεται σε ιντρονική περιοχή του γονιδίου. Οι ιντρονικές περιοχές θεωρούνταν για μεγάλο χρονικό διάστημα, ως επί το πλείστον, μη λειτουργικές και οι μεταλλάξεις που ανιχνεύονταν στο εσωτερικό των ιντρονίων αγνοούνταν ως πιθανές αιτίες ανθρώπινης νόσου. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια κλινικά προσανατολισμένες ερευνητικές εργασίες έχουν μελετήσει πληθώρα ιντρονικών μεταλλάξεων με σημαντική συσχέτιση με γενετικά νοσήματα. Οι ιντρονικές μεταλλάξεις είναι πιθανό να οδηγούν σε τροποποιήσεις στο επίπεδο της μεταγραφής. Η ύπαρξη των ιντρονικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1* έχει επιχειρηθεί να διερευνηθεί, παρόλα αυτά σημαντική τροχοπέδη της προσπάθειας αυτής αποτέλεσαν οι συμβατικές μέθοδοι, οι οποίες δεν επέτρεπαν την ανάλυση του συνόλου των ιντρονικών περιοχών του γονιδίου *SERPING1*. Επομένως, μόνο ένας μικρός αριθμός ιντρονικών μεταλλάξεων έχει συσχετιστεί με την τροποποίηση της μεταγραφής των εξωνικών περιοχών. Παρά ταύτα, η αυξανόμενη χρήση της αλληλούχησης νέας γενιάς που στοχεύει στην αλληλούχηση της πλήρους γονιδιωματικής αλληλουχίας έχει σίγουρα αλλάξει τη μελέτη των κληρονομικών ασθενειών και έχει δώσει τη δυνατότητα ανάλυσης του συνόλου του γονιδίου *SERPING1*.

Επιπρόσθετα, το FXII-HAE έχει συσχετιστεί με μεταλλάξεις στο γονίδιο *F12*. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευτεί τέσσερις παθογονικές μεταλλάξεις, δύο σημειακές μεταλλάξεις, μία έλλειψη 72 bp και ένας διπλασιασμός 18 bp, στο εξώνιο 9 του γονιδίου *F12* και έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση του κληρονομικού αγγειοοιδήματος. Επιπλέον, ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs1801020 έχει αποδειχθεί ότι ενεργεί ως ανεξάρτητος τροποποιητής της βαρύτητας του C1-INH-HAE.

Η μελέτη σχεδιάστηκε με στόχο την ανίχνευση και τη διερεύνηση της παθογονικότητας των νέων ιντρονικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1* για τους ασθενείς με κληρονομικό αγγειοοίδημα με ανεπάρκεια του C1-INH χωρίς μεταλλάξεις στις εξωνικές περιοχές του γονιδίου.

Επιπλέον, στόχος αποτέλεσε η αλληλούχηση των εξωνικών περιοχών του γονιδίου *F12* για την ανίχνευση νέων μεταλλάξεων που δυνητικά θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εμφάνιση του FXII-HAE.

Η διδακτορική αυτή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Αναστάσιου Ε. Γερμενή, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την αμέριστη υποστήριξη του. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας κ. Ματθαίο Σπελέτα και την Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας και Κλινικής Μικροβιολογίας κ. Ευθυμία Πετεινάκη, για το χρόνο που αφιέρωσαν για τη μελέτη και την αξιολόγηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά το σύνολο του προσωπικού του Εργαστηρίου Κυτταρικών και Μοριακών Ανοσολογικών Εφαρμογών CEMIA και ιδιαίτερα την διδάκτορα Μαρία Ζαμανάκου για τις ατέλειωτες ώρες που αφιέρωσε να μου μεταδώσει τις γνώσεις της, για την πολύτιμη βοήθεια της, και την υποστήριξη της. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γεδεών Λουλέ για την εργαστηριακή εκπαίδευση που μου χάρισε, την πολύτιμη βοήθεια του, τις χρήσιμες συμβουλές του και την καθοδήγηση σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Στις κυρίες Λουκία Ποταμιάνου, Κλεοπάτρα Γραβάνη και Ελένη Τσιφτέ οφείλω ένα ευχαριστώ για την ατμόσφαιρα που δημιούργησαν και την άριστη συνεργασία τους.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στην κ. Ειρήνη Σεβδαλή οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ για την βοήθεια της στην εκπόνηση των πειραμάτων μου, καθώς σε στέρηση του δικού της χρόνου ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και να με κατευθύνει σε ότι χρειάστηκα σε όλη την πορεία μου. Δεν πρόκειται να ξεχάσω ποτέ την βοήθεια που μου πρόσφερε απλόχερα η κ. Γερασμίνα Τσιντή, η οποία με βοήθησε στην εκπόνηση των πειραμάτων μου και αποτέλεσε ένα εξαιρετικό παράδειγμα επιστήμονα από το οποίο διδάχθηκα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ματθαίο Σπελέτα, τον Δρ. Φώτη Ψαρρό, τη Δρ. Henriette Farkas, τη Δρ. Dorottya Csuka, τη Δρ. Anna Valerieva, τον Δρ. Gregor Porebski, τον Δρ. Markus Maurer και τον Δρ Markus Magerl για την παροχή των δειγμάτων από ασθενείς με κληρονομικό αγγειοίδημα, χωρίς τα οποία δεν θα ήταν εφικτή η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου για την αγάπη τους και την αμέριστη στήριξη τους σε όλη τη μέχρι τώρα πορεία μου. Τέλος, αφιερώνω τη διδακτορική διατριβή μου στον Γιώργο μου, ο οποίος αποτέλεσε στήριγμα σε όλη την πορεία μου.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ACE** (Angiotensin-converting enzyme): Μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης
- ACEI** (Angiotensin-converting enzyme inhibitors): Αναστολέας ενζύμου μετατροπής αγγειοτενσίνης
- ACEI-AAE** (Angioedema Related to Angiotensin-Converting Enzyme): Αγγειοοίδημα που σχετίζεται με το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης
- ACMG** (American College of Medical Genetics and Genomics): Αμερικανικό Κολλέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γονιδιωματικής
- AMP** (Association for Molecular Pathology): Σύλλογος Μοριακής Παθολογίας
- ANGPT1** (Angiotensin 1): Αγγειοποιητίνη-1
- ANGPT1-HAE** (Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and angiotensin-1 gene mutation): Κληρονομικό αγγειοοίδημα με φυσιολογικό αναστολέα C1 εστεράσης και μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την αγγειοποιητίνη-1
- ASSP** (Alternative Splice Site Predictor): Βιοπληροφορικό εργαλείο ανεύρεσης θέσεων ματίσματος
- B2R** (Bradykinin-2 receptor): Υποδοχέας βραδυκινίνης-2
- BK** (Bradykinin): Βραδυκινίνη
- C1-INH** (C1-inhibitor inhibitor): Αναστολέας C1 εστεράσης
- C1-INH-AAE** (Acquired angioedema due to acquired C1-inhibitor deficiency): Επίκτητο αγγειοοίδημα λόγω επίκτητης ανεπάρκειας C1-αναστολέα
- C1-INH-HAE** (Hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency): Κληρονομικό αγγειοοίδημα με ανεπάρκεια αναστολέα C1 εστεράσης
- CADD** (Combined Annotation Dependent Depletion): Βιοπληροφορικό εργαλείο πρόβλεψης παθογονικότητας
- CK1** (Cytokeratin 1): Κυτοκερατίνη 1
- CNV** (Copy Number Variation): Παραλλαγές στον αριθμό αντιγράφων
- CPN1** (Carboxypeptidase N): Καρβοξυπεπτιδάση N
- EGF** (Epidermal growth factor): Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
- EJC** (exon-junction complexes): Συμπλέγματα εξωνίων
- ESE** (Exonic splicing enhancer): Εξωνικός ενισχυτής ματίσματος
- ESS** (Exonic splicing silencer): Εξωνικός καταστολέας ματίσματος
- Factor XII** (Coagulation factor XII): Παράγοντα πήξης XII
- FXII-HAE** (Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and factor XII mutation): Κληρονομικό αγγειοοίδημα με φυσιολογικό αναστολέα C1 εστεράσης και μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα πήξης XII
- GERP** (Genomic Evolutionary Rate Profiling): Βιοπληροφορικό εργαλείο που εξετάζει τον εξελικτικό ρυθμό μίας γονιδιακής περιοχής
- HMWK** (High-molecular-weight kininogen): Κινογόνο υψηλού μοριακού βάρους
- hnRNPs** (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins): Ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες
- HS3OST6** (Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 6): Ηπαράνη θειική γλυκοζαμίνη 3-O-σουλφοτρανσφεράση 6
- HSF** (Human Splicing Finder): Βιοπληροφορικό εργαλείο ανεύρεσης θέσεων λανθασμένου ματίσματος
- IGV** (Integrative Genome Viewer): Ολοκληρωμένο Πρόγραμμα Προβολής Γονιδιώματος



**INH-AAE** (Idiopathic nonhistaminergic acquired angioedema): Ιδιοπαθές μη ισταμινεργικό επίκτητο αγγειοίδημα

**ISE** (Intronic splicing enhancer): Ιντρονικός ενισχυτής ματίσματος

**ISS** (Intronic splicing silencer): Ιντρονικός καταστολέας ματίσματος

**KAL** (Kallikrein): Καλλικρεΐνη πλάσματος

**KNG1** (Kininogen 1): Κινινογόνου 1

**KNG1-HAE** (Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and Kininogen 1 mutation): Κληρονομικό αγγειοίδημα με φυσιολογικό αναστολέα C1 εστερασης και μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί το κινινογόνου 1

**LMWK** (Low-molecular-weight kininogen): Κινινογόνο χαμηλού μοριακού βάρους

**miRNAs** (micro RNAs): Μικρά μη-κωδικοποιούμενα RNA μονής έλικας

**MYOF** (Myoferlin): Μυοφερλίνη

**nC1-INH-HAE** (Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor deficiency): Κληρονομικό αγγειοίδημα με φυσιολογικό αναστολέα C1 εστεράσης

**NGD** (no-go mRNA decay): No-go αποικοδόμηση

**NGS** (Next Generation Sequencing): Αλληλούχηση Νέας Γενεάς

**NI** (No impact): Χωρίς αντίκτυπο

**NMD** (Nonsense-mediated decay): Διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση

**NP** (Not provided): Δεν παρέχεται

**NSD** (Nonstop decay): Αποικοδόμηση μη-τερματισμού

**PAI** (Plasminogen activator inhibitor): Αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου

**PK** (Prekallikrein): Προκαλλικρεΐνη

**PLG** (Plasminogen): Πλασμινογόνο

**PLG-HAE** (Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and plasminogen mutation): Κληρονομικό αγγειοίδημα με φυσιολογικό αναστολέα C1 εστεράσης και μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί το πλασμινογόνο

**PRCP** (Serine protease prolylcarboxypeptidase): Πρωτεάση σερίνης προλυλοκαρβοξυπεπτιδάσης

**PTC** (premature stop codon): Πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού

**RCL** (reactive centre loop): Κινητός κεντρικός βρόχος

**scuPA** (Single-chain urokinase-type plasminogen activator): Ενεργοποιητής πλασμινογόνου μονής αλυσίδας τύπου ουροκινάσης

**snoRNAs** (Small nucleolar RNA): Μικρό πυρηνικό RNA

**TIE2** (Tyrosine-protein kinase): Κινάση της πρωτεΐνης τυροσίνης

**tPA** (Tissue plasminogen activator): Ενεργοποιητής πλασμινογόνου

**Trap score** (Transcript-inferred Pathogenicity score): Βιοπληροφορικό εργαλείο πρόβλεψης παθογονικότητας

**U-HAE** (Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and of unknown origin): Κληρονομικό αγγειοίδημα με φυσιολογικό αναστολέα C1 εστεράσης και άγνωστη προέλευση

**uPA** (Urokinase-type plasminogen activator): Ενεργοποιητής πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης

**uPAR** (Urokinase plasminogen activator receptor): Υποδοχέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου ουροκινάσης

**VEGF** (Vascular endothelial growth factor): Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

**VEGFR2** (Vascular endothelial growth factor receptor 2): Υποδοχέας αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2

**VUS** (Variants of uncertain significance): Μετάλλαξη άγνωστης παθογονικότητας

**WES** (Whole Exome Sequencing): Αλληλούχηση των κωδικοποιουσών περιοχών  
**WGS** (Whole Genome Sequencing): Αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Σε περίπου 9,2% των ασθενών με κληρονομικό αγγειοίδημα λόγω ανεπάρκειας του αναστολέα C1 εστεράσης, η παθογόνος μετάλλαξη δεν ανιχνεύεται με την αλληλούχηση των εξωνίων του *SERPING1*. Συμπεραίνεται ως εκ τούτου ότι η αιτιατή μετάλλαξη μπορεί να εντοπίζεται σε ιντρονική περιοχή του γονιδίου. Επιπλέον, μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευτεί τέσσερις παθογονικές μεταλλάξεις στο εξώνιο 9 του *F12* και έχουν συσχετιστεί με το FXII-HAE. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αναζήτηση μεταλλάξεων στο *F12* πέρα από το εξώνιο 9. Κατόπιν αυτών σκοπός της μελέτης αποτέλεσε (α) η ανίχνευση παθογονικών ιντρονικών μεταλλάξεων στο *SERPING1* και (β) η ανίχνευση νέων μεταλλάξεων στο γονίδιο *F12* που δυνητικά ευθύνονται για την εμφάνιση του FXII-HAE.

**Ασθενείς και Μεθοδολογία:** Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία αλληλούχησης νέας γενεάς, η οποία στοχεύει ολόκληρο το *SERPING1*, προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες δεκαπέντε ασθενών με C1-INH-HAE χωρίς μεταλλάξεις στις εξωνικές περιοχές του γονιδίου. Από τις ιντρονικές μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν μελετήθηκαν αυτές που είχαν συχνότητα μικρότερη από 5% και εξετάστηκαν με τη χρήση δέκα βιοπληροφορικών εργαλείων. Για τις φιλτραρισμένες μεταλλάξεις πραγματοποιήθηκαν οικογενειακές και λειτουργικές μελέτες στο επίπεδο του mRNA. Με στόχο την αλληλούχηση του γονιδίου *F12*, γονοτυπήθηκαν με τη πλατφόρμα NGS 197 ασθενείς με nC1-INH-HAE, 161 ασθενείς με C1-INH-HAE και 46 υγιή μέλη των οικογενειών τους. Η επαλήθευση των ανιχνευμένων μεταλλάξεων και οι οικογενειακές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger.

**Αποτελέσματα:** Από τις 37 ιντρονικές μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στο γονίδιο *SERPING1*, διερευνήθηκαν περαιτέρω τρεις μεταλλάξεις, c.-22-155G>T, c.890-14C>G, c.1029+384A>G. Τα βιοπληροφορικά εργαλεία χαρακτήρισαν τις μεταλλάξεις ως παθογονικές, ενώ οι οικογενειακές μελέτες έδειξαν ότι οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται μόνο στα ασθενή μέλη της εκάστοτε οικογένειας. Η λειτουργική μελέτη για τη μετάλλαξη c.-22-155G>T έδειξε αποικοδόμηση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Επιπλέον, στο *F12* εντοπίστηκαν έξι μεταλλάξεις, τέσσερις από τις οποίες χαρακτηρίστηκαν ως καλοήθειες (c.41T>C, c.418C>G, c.1025C>T, c.530C>T) και δύο μεταλλάξεις άγνωστης παθογονικότητας (c.1530G>C, c.1768T>G). Τρεις συνώνυμες μεταλλάξεις (c.756C>T, c.711C>T, c.1599A>G), ο κοινός πολυμορφισμός c.619G>C και ο λειτουργικός πολυμορφισμός c.-4T>C ανιχνεύθηκαν σε συχνότερες αλληλομόρφων παρόμοιες με αυτές που παρουσιάζονται στη βάση gnomAD για τον ευρωπαϊκό πληθυσμό. Τέλος, ανιχνεύτηκαν οι δύο δημοσιευμένες παθογονικές μεταλλάξεις c.983C>A και c.892\_909dup.

**Συμπεράσματα:** Τρεις από τις 37 ιντρονικές μεταλλάξεις στο *SERPING1* χαρακτηρίστηκαν ως παθογονικές και πιθανώς παθογονικές για το C1-INH-HAE. Επομένως, η χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης νέας γενεάς θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις C1-INH-HAE, όπου οι τυπικές προσεγγίσεις αποτυγχάνουν να αποκαλύψουν τη αιτιατή μετάλλαξη. Επιπλέον, η ανάλυση ολόκληρης της μεταφραζόμενης περιοχής του *F12* είναι σημαντική για την ανίχνευση νέων μεταλλάξεων που πιθανώς οδηγούν στην εμφάνιση του FXII-HAE.

## ABSTRACT

**Objective:** In approximately 9.2% of patients with C1-INH-HAE, no causal variant has been identified by standard mutational screening, which is ordinarily restricted to the coding exons of the *SERPING1*. This suggests that, in some patients, the causative variant that modifies C1-INH expression may be located in the intronic region of *SERPING1*. Furthermore, until now four pathogenic variants have been identified in exon 9 of *F12* and have been associated with FXII-HAE. Of interest is the search for alterations in *F12* beyond exon 9. The purpose of this study was (a) to detect pathogenic intronic variants in *SERPING1* and (b) to detect new *F12* variants that are potentially responsible for the FXII-HAE pathogenesis.

**Material and Methods:** Using NGS platform targeting the entire *SERPING1*, 15 DNA samples belonging to C1-INH-HAE patients with no detectable mutations in the coding region of the gene were sequenced. Of the intronic variants identified, those with frequency less than 5% were analyzed using ten bioinformatics tools. Pedigree analysis and examination of their pathogenic effect on the mRNA level were performed for filtered variants. Furthermore, DNA samples from 197 patients with nC1-INH-HAE, 161 patients with C1-INH-HAE and 46 healthy family members were genotyped by targeted NGS aiming the sequencing of the *F12*. Sanger sequencing was performed for the verification of all identified variants and family segregation studies.

**Results:** Of the 37 intronic variants detected in the *SERPING1*, only three were further examined, c.-22-155G>T, c.890-14C>G and c.1029+384A>G. Bioinformatics tools predicted the variants as pathogenic, while pedigrees analysis showed its co-segregation with the disease. Functional study for the c.-22-155G>T variant showed degradation of the mutant allele. Moreover, six variants were identified in *F12*, four of which were characterized as benign (c.41T>C, c.418C>G, c.1025C>T, c.530C>T) and two of uncertain significance (c.1530G>C, c.1768T>G). Three synonymous variants (c.756C>T, c.711C>T, c.1599A>G), the common polymorphism c.619G>C and the functional polymorphism c.-4T>C were detected in allele frequencies similar to those presented in the gnomAD database for the European population. Finally, the two published pathogenic variants, c.983C>A and c.892\_909dup, were detected.

**Conclusions:** Three intronic variants were detected by NGS in the *SERPING1* and were proven as pathogenic and likely pathogenic for C1-INH-HAE. Therefore, advanced DNA sequencing methods should be performed in cases of C1-INH-HAE where standard approaches fail to uncover the genetic alteration. Furthermore, analyzing the entire translated region of *F12* is important in order to identify new variants that possibly affect HAE expressivity.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

---

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο όρος «αγγειοοίδημα» δημιουργήθηκε για πρώτη φορά το 1586 και αποδίδεται στον Marcelo Donati, ο οποίος περιέγραψε έναν νεαρό που παρουσίασε ευαισθησία σε συγκεκριμένο είδος τροφής και ανέπτυξε οίδημα στα χείλη [1]. Το αγγειοοίδημα ορίζεται ως το τοπικό και αυτοπεριοριζόμενο οίδημα στον υποδόριο και τον υποβλεννογόνο ιστό, διάρκειας 2 έως 5 ημερών εμφανιζόμενο κυρίως στα άκρα, στο πρόσωπο, στη γαστρεντερική και στην αναπνευστική οδό, λόγω προσωρινής αύξησης της αγγειακής διαπερατότητας που προκαλείται από την απελευθέρωση αγγειοδραστικού μεσολαβητή. Το 1882, ο Ελβετός γιατρός, Heinrich Quincke παρουσίασε μία πλήρη ιατρική έκθεση στην οποία αναγνώριζε το αγγειοοίδημα ως ξεχωριστή οντότητα και το ονόμασε «αγγειονευρωτικό οίδημα» [2, 3]. Ο Sir William Osler [4] περιέγραψε το αγγειοοίδημα ως μια διακριτή νοσολογική οντότητα και τόνισε την κληρονομική φύση της νόσου και το μετονόμασε σε «κληρονομικό αγγειονευρωτικό οίδημα». Το αγγειοοίδημα έλαβε περαιτέρω αναγνώριση τη δεκαετία του 1960 μετά την ανακάλυψη περιπτώσεων αγγειοοιδήματος σε σουηδικά αρχεία εκκλησιών τα οποία χρονολογούνταν στον 17ο αιώνα [5]. Το 1961, οι Lerow et al ανακάλυψαν τον αναστολέα C1 εστεράσης (C1-INH) [6]. Την ίδια εποχή, ο Landeman και οι συνεργάτες του περιέγραψαν έναν ασθενή με κληρονομικό αγγειοοίδημα, ο οποίος παρουσίαζε χαμηλές ποσότητες αναστολέα της καλλικρεΐνης και πρότεινε ότι η καλλικρεΐνη μπορεί να εκκινεί το σχηματισμό του οιδήματος. Το 1963, οι Donaldson και Evans ανακάλυψαν ότι οι ασθενείς με κληρονομικό αγγειοοίδημα είχαν χαμηλά επίπεδα C1-INH [7, 8].

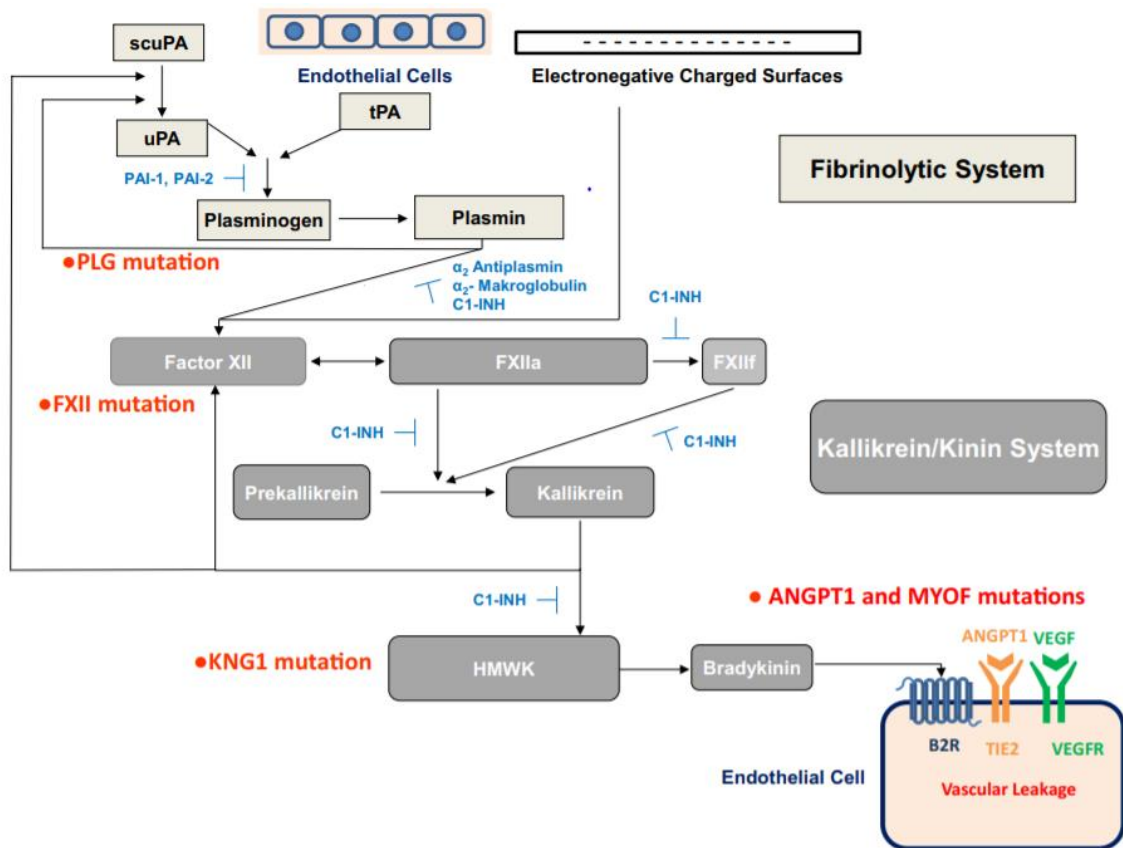
Δύο διαφορετικοί τύποι κληρονομικού αγγειοοιδήματος που προκαλούνται από ανεπάρκεια λειτουργικής C1-INH (C1-INH-HAE) έχουν ταυτοποιηθεί. Οι φαινοτυπικές εκδηλώσεις και των δύο τύπων είναι παρόμοιες [9, 10]. Ο επιπολασμός του C1-INH-HAE εκτιμάται περίπου 1 στα 50.000 άτομα παγκοσμίως [11]. Το κληρονομικό αγγειοοίδημα τύπου I είναι η πιο συνηθισμένη μορφή C1-INH-HAE (85% των περιπτώσεων) και προκαλείται από ανεπαρκή επίπεδα C1-INH. Το κληρονομικό αγγειοοίδημα τύπου II αποτελεί την λιγότερο κοινή μορφή του C1-INH-HAE (15% των περιπτώσεων) και χαρακτηρίζεται από φυσιολογικά επίπεδα C1-INH, αλλά χαμηλά επίπεδα λειτουργικού C1-INH [12].

Το 1972, οι Caldwell et al εντόπισαν μία νέα μορφή αγγειοοιδήματος στο οποίο η ανεπάρκεια του C1-INH δεν ήταν κληρονομική, αλλά επίκτητη και σχετιζόμενη με το λεμφοσάρκωμα (C1-INH-AAE) [13]. Στα επόμενα χρόνια, η έρευνα του αγγειοοιδήματος επικεντρώθηκε στην παθοφυσιολογία του αγγειοοιδήματος που σχετίζεται με την ανεπάρκεια του C1-INH, η οποία εν τέλει αποδείχθηκε ότι προκαλείται από τη βραδυκινίνη [14].

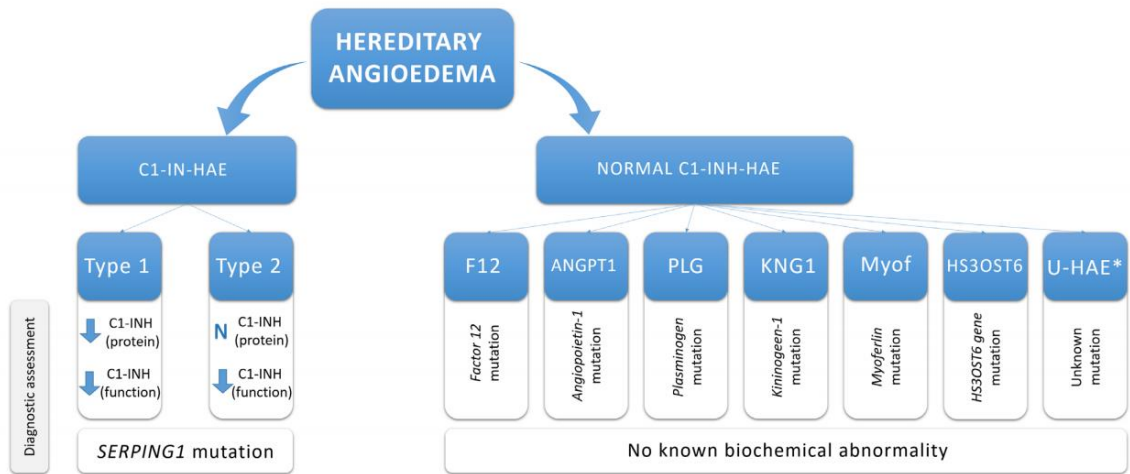
Το 2000, οι Bork et al [15] περιέγραψαν μία νέα μορφή κληρονομικού αγγειοοιδήματος με φυσιολογικό C1-INH (nC1-INH-HAE) με παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά με το C1-INH-HAE, ωστόσο το nC1-INH-HAE παρουσίαζε μέση ηλικία έναρξης συμπτωμάτων μεταγενέστερη από το C1-INH-HAE [16]. Επιπλέον, τα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονταν κυρίως σε γυναίκες, ενώ το έναυσμα για την έναρξη των επεισοδίων αγγειοοιδήματος αποτελούσε η λήψη αντισυλληπτικών, η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης ή η εγκυμοσύνη, υποδηλώνοντας ένα σημαντικό ρόλο των οιστρογόνων στην εκδήλωση του νοσήματος.

Τα τελευταία πενήντα χρόνια, έχουν σημειωθεί πρόσθετες εξελίξεις στη κατανόηση της γενετικής και της παθογένεσης του κληρονομικού αγγειοοιδήματος, οι οποίες έχουν οδηγήσει σε όλο και πιο αποτελεσματικές θεραπείες. Σημαντικό ρόλο στη μελέτη του γενετικού υπόβαθρου του νοσήματος διαδραμάτισε η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών αλληλούχησης, όπως η αλληλούχηση νέας γενεάς, οι οποίες διευκόλυναν την εκτεταμένη ανάλυση και διερεύνηση νέων γονιδίων που

πιθανόν να εμπλέκονται στη παθογένεση του αγγειοοιδήματος. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί πάνω από 700 μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1*, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα ανεπαρκή (C1-INH-HAE τύπου I) ή δυσλειτουργικό C1-INH (C1-INH-HAE τύπου II), το οποίο οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή βραδυκινίνης. Το κληρονομικό αγγειοοίδημα με φυσιολογικό C1-INH (nC1-INH-HAE) μέχρι σήμερα έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις στα γονίδια *FXII* [16], πλασμινογόνου (*PLG*) [17], αγγειοποιητίνη 1 (*ANGPT1*) [18], κινινογόνου 1 (*KNG1*) [19] και μυοφερλίνης (*MYOF*) [20] δηλαδή σε γονίδια που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του συστήματος καλλικρεΐνης-κινίνης (Εικόνα 1). Το 2021, το nC1-INH-HAE συσχετίστηκε με μία νέα μετάλλαξη στο γονίδιο ηπαράνης θειική γλυκοζαμίνη 3-Ο-σουλφοτρανσφεράση 6 (*HS3OST6*) [21]. Οι ασθενείς, στους οποίους το αγγειοοίδημα είναι σαφώς κληρονομικό και δεν εντοπίζεται γενετική αιτία, ταξινομούνται ως νοσούντες από αγγειοοίδημα άγνωστης προέλευσης (U-HAE) (Εικόνα 2).



**Εικόνα 1:** Μεταλλάξεις στα γονίδια *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1* και *MYOF* που συνδέονται με διάφορους τύπους nC1-INH-HAE και η επίδρασή τους στο ινωδολυτικό σύστημα και το σύστημα καλλικρεΐνης-κινίνης [22]. Δεν εμφανίζεται η πρόσφατη μετάλλαξη στο γονίδιο *HS3OST6*.



**Εικόνα 2:** Ταξινόμηση του αγγειοοιδήματος χωρίς κνίδωση [23].

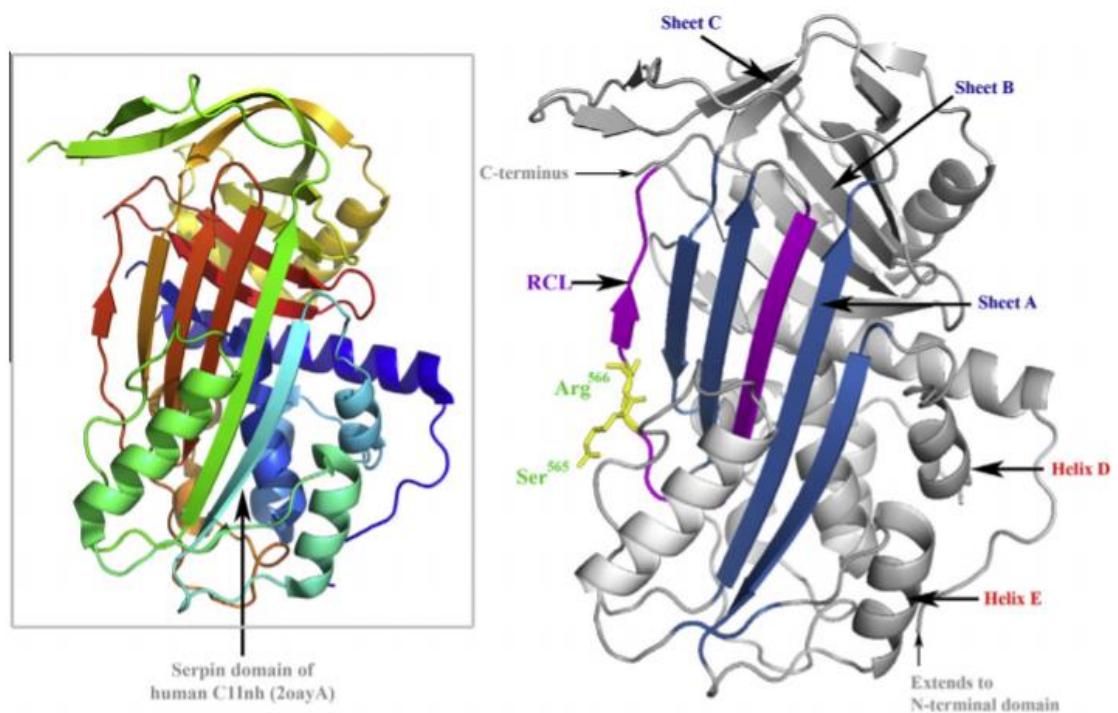


## 2. C1-INH-HAE

### 2.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ C1-INH-HAE

Το C1-INH-HAE (OMIM: 106100) είναι ένα σπάνιο πιθανώς θανατηφόρο νόσημα που κληρονομείται με αυτοσωματικό επικρατές χαρακτήρα, ο οποίος εκδηλώνεται με επαναλαμβανόμενα επεισόδια οιδήματος σε διάφορα μέρη του σώματος [24]. Το νόσημα προκαλείται από μεταλλάξεις του γονιδίου *SERPINC1*, που κωδικοποιεί τον C1-INH.

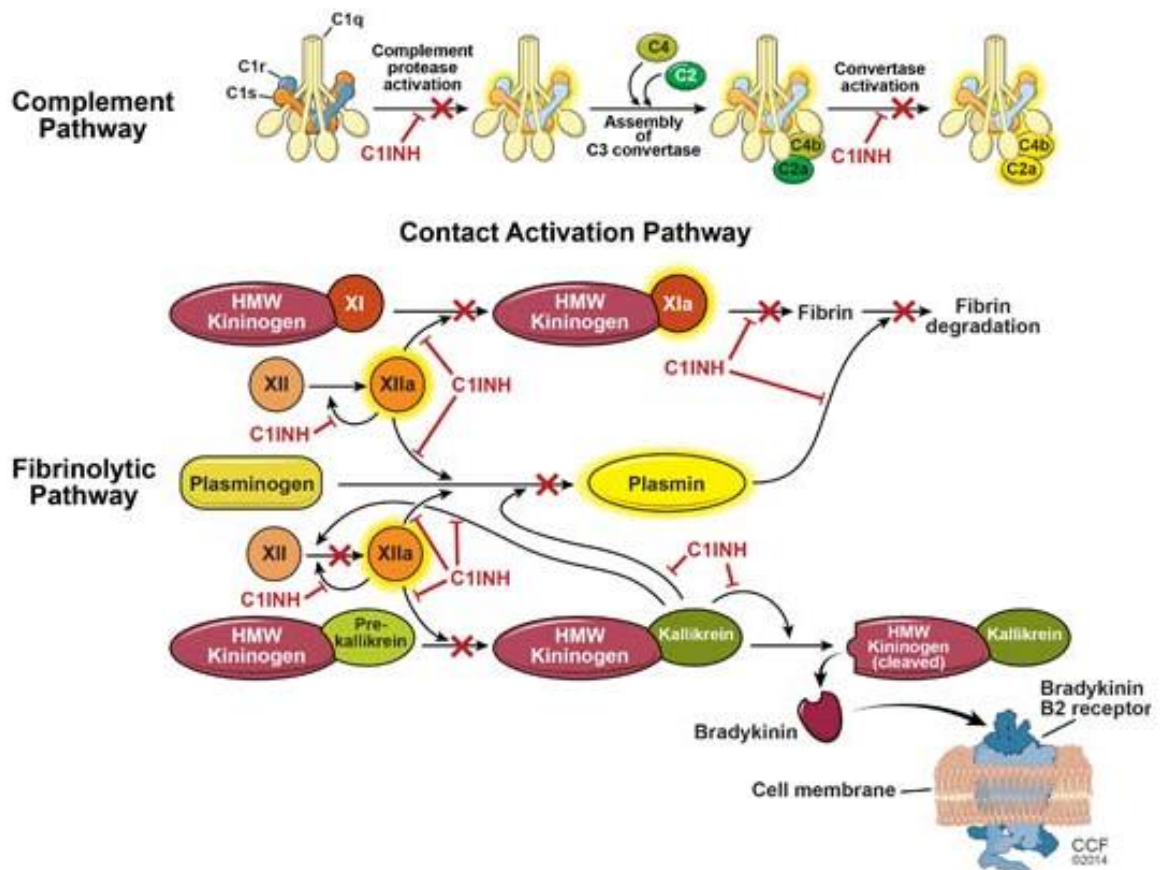
Ο C1-INH είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης σερίνης. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 478 αμινοξέων [25], η οποία παίζει κεντρικό ρόλο στην αγγειακή ομοιόσταση. Το μοριακό του βάρος είναι 76 kDa [26] και περιέχει 13 θέσεις γλυκοζυλίωσης. Ο C1-INH αποτελείται από ένα N-τερματικό τομέα 113 αμινοξέων και μια περιοχή σερίνης 365 αμινοξέων. Η πρωτεΐνη είναι σφαιρική και αποτελείται από 9 α-έλικες, 3 β-φύλλα και ένα εκτεθειμένο κινητό κεντρικό βρόχο (RCL) [27], ο οποίος βρίσκεται έξω από το κεντρικό β-φύλλο και αλληλεπιδρά με τις πρωτεάσες-στόχους. Τα κατάλοιπα που λαμβάνουν μέρος στην αλληλεπίδραση με τις πρωτεάσες-στόχους είναι τα P1 και P1', Arg444-Thr445. Με την ομοιοπολική πρόσδεση της πρωτεάσης-στόχου στον C1-INH διασπάται ο δεσμός Arg444-Thr445 και μετατοπίζεται η πρωτεάση-στόχος επί του C1-INH [28] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης C1-INH [29].

Ο C1-INH αποτελεί κύριος ρυθμιστής στον καταρράκτη του συμπληρώματος, στην πήξη και στα συστήματα επαφής. Ασκεί σημαντική ανασταλτική επίδραση στις κύριες πρωτεάσες σε αυτές τις οδούς, συμπεριλαμβανομένου του παράγοντα Hageman, της καλλικρεΐνης και της πλασμίνης. Η βασική λειτουργία του C1-INH είναι η πρόληψη της περιττής ενεργοποίησης της κλασικής οδού του συμπληρώματος που ενεργεί στις πρωτεάσες C1s και C1r [30]. Επιπρόσθετα, μετέχει στον έλεγχο των πρωτεασών MASP-1 και MASP-2 της οδού λεκτίνης της μαννόζης και ρυθμίζει την

παραγωγή των κινινών εμποδίζοντας την ενεργοποίηση της καλλικρεΐνης του πλάσματος και του παράγοντα πήξης XII, αποτελώντας έτσι ρυθμιστικό παράγοντα του συστήματος κίνινης-καλλικρεΐνης στο πλάσμα, δηλαδή του συστήματος επαφής [31, 32]. Τέλος, ο C1-INH αναστέλλει τις πρωτεάσες του ινωδολυτικού συστήματος και τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1* προκαλούν ανεπάρκεια του C1-INH, το οποίο οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής της βραδυκινίνης, αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και κατά συνέπεια οίδημα [33] (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4:** Η ποσοτική ή λειτουργική ανεπάρκεια του C1-INH οδηγεί σε απορρύθμιση των οδών του συμπληρώματος, της οδού επαφής και της ινωδολυτικής οδού.

Το γονίδιο *SERPING1* (Ensembl: ENSG00000149131 OMIM: 606860) εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 11q12-q13.1 και εκτείνεται σε 17.159 bp, ενώ αποτελείται από 8 εξώνια και 7 ιντρόνια [15]. Ο υποκινητής του γονιδίου δεν διαθέτει αλληλουχία TATA, αλλά έναν εκκινητή τύπου-TdT και μία οδό πολυπουρίνης-πολυπυριμιδίνης. Το πρώτο εξώνιο περιέχει 38 bp μη κωδικοποιούσας αλληλουχίας και το δεύτερο έχει ένα σήμα πεπτιδίου 22 bp πριν από την πρώτη μεθειονίνη. Δημιουργεί ένα mRNA 1827 bp εξαιρουμένης της πολύ (A) ουράς. Το γονίδιο *SERPING1* υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα. Το φυσιολογικό μετάγραφο (GeneBank: NM\_000062.2) περιέχει το σύνολο των εξώνιων του γονιδίου και κωδικοποιεί ένα πλήρως λειτουργικό C1-INH, ενώ ο ρόλος άλλων εναλλακτικών μεταγράφων, συμπεριλαμβανομένης της δεύτερης πιο συχνής παραλλαγής στην οποία παραλείπεται το εξώνιο 3 [34], δεν έχει γίνει ακόμη κατανοητό [35]. Τα 7 ιντρόνια παρουσιάζουν υψηλή πυκνότητα διασκορπισμένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών Alu [36], καθιστώντας το γονίδιο επιρρεπές σε μεγάλες ελλείψεις και διπλασιασμούς.

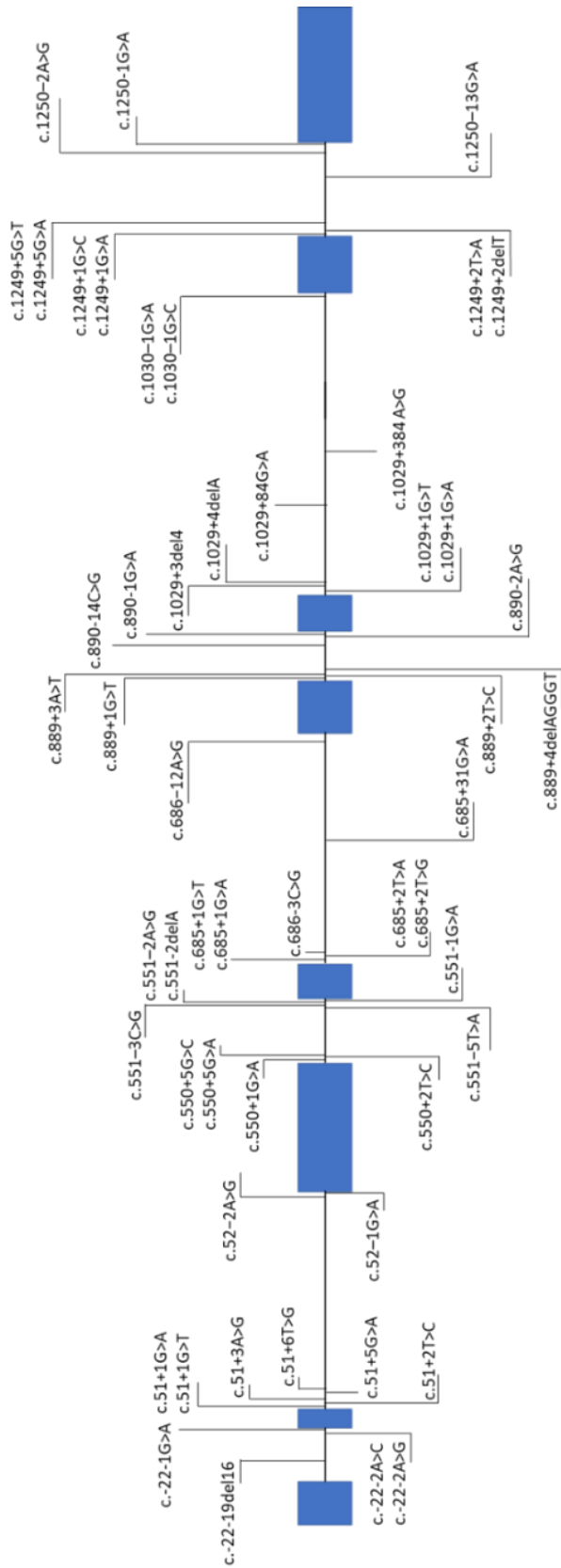
Το C1-INH-HAE διαγιγνώσκεται βάσει κλινικών και βιοχημικών ευρημάτων. Παρόλα αυτά, η εύρεση του γονότυπου του *SERPING1* απαιτείται σε ορισμένες ειδικές καταστάσεις [37], ενώ η ανίχνευση της αιτιολογικής μετάλλαξης είναι απαραίτητη για μια επιτυχημένη προγεννητική ή προεμφυτευτική διάγνωση του C1-INH-HAE [38] καθώς και για τη γονιδιακή θεραπεία [39]. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευτεί 748 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1* που προκαλούν C1-INH-HAE. Οι μεταλλάξεις είναι κυρίως εκτεταμένες αναδιατάξεις (indels), μετατόπισης πλαισίου (frameshift), παρανοηματικές (missense), μη νοηματικές (nonsense) και μεταλλάξεις που προκαλούν μάτισμα. Οι μεταλλάξεις ματίσματος αντιπροσωπεύουν το 13% όλων των μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1* και το 47% από αυτές βρίσκονται σε συντηρημένες περιοχές που εκτείνονται από τη θέση -2 έως +2 θέση στα όρια εξωνίων-ιντρονίων. [40]

## 2.2. ΙΝΤΡΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *SERPING1*

Η ύπαρξη των ιντρονικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1* που οδηγούν στο C1-INH-HAE έχει επιχειρηθεί να διερευνηθεί, ωστόσο μικρός αριθμός ιντρονικών μεταλλάξεων έχει συσχετιστεί με την τροποποίηση της μεταγραφής των εξωνικών περιοχών του γονιδίου [41, 42]. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευτεί 52 ιντρονικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1* που οδηγούν σε C1-INH-HAE (Εικόνα 5). Η πλειονότητα των μεταλλάξεων που έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση C1-INH-HAE εντοπίζονται στις δύο πρώτες βάσεις (GU) (5' θέση ματίσματος-donor site) και στις δύο τελευταίες βάσεις του εκάστοτε ιντρονίου (AG) (3' θέση ματίσματος-acceptor site) του γονιδίου *SERPING1*. Οι μεταλλάξεις στις θέσεις ματίσματος μπορεί να οδηγήσουν στην παράλειψη κάποιου εξωνίου, στην ενεργοποίηση μίας κρυφής θέσης ματίσματος, στη δημιουργία ενός ψευδο-εξωνίου, ή στην διατήρηση ενός ιντρονίου [43]. Η παράκαμψη ενός εξωνίου θεωρείται η πιο συχνή επίπτωση μίας μετάλλαξης στις θέσεις ματίσματος [44].

Η πρώτη αναφορά σε ιντρονική μετάλλαξη στο γονίδιο *SERPING1*, η οποία σχετίζεται με το C1-INH-HAE έγινε το 1991 από τους Siddique et al. Μελέτησαν μία οικογένεια με C1-INH-HAE και ανίχνευσαν τη μετάλλαξη c.1029+1G>T στη πρώτη βάση του ιντρονίου 6 στη 5' θέση ματίσματος (donor site) [45]. Οι ερευνητές δεν μπόρεσαν να αποδείξουν τη λειτουργία της μετάλλαξης στο επίπεδο του mRNA, καθώς το mRNA ήταν φυσιολογικό. Ωστόσο, το κανονικό mRNA είχε σχετική αφθονία περίπου 50%, γεγονός που υποδηλώνει ότι το αντίγραφο του μεταλλαγμένου αλληλίου δεν μετατράπηκε σε ένα σταθερό mRNA, αλλά αποικοδομήθηκε ταχύτατα από ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυττάρου.

Οι μεταλλάξεις c.-22-2A>C [46], c.-22-2A>G [47] και c.-22-1G>A [34, 48, 49, 50, 51] στις δύο τελευταίες βάσεις του ιντρονίου 1 οδηγούν σε τροποποίηση της 3' θέσης ματίσματος (acceptor site) και επηρεάζουν την σωστή μεταγραφή του γονιδίου με τον αποκλεισμό του εξωνίου 2 από το παραγόμενο mRNA, όπως απέδειξαν οι Duponchel et al [34].



**Εικόνα 5:** Οι 52 ιντρονικές μεταλλάξεις οι οποίες έχουν ανιχνευτεί στο γονίδιο *SERPING1*.

Την 5' θέση ματίσματος του ιντρονίου 2 επηρεάζουν οι μεταλλάξεις c.51+1G>T [52, 53], c.51+1G>A (rs1470120365) [49, 50, 54, 55], c.51+2T>C [53], ενώ την 3' θέση ματίσματος του ιντρονίου 2 οι μεταλλάξεις c.52-2A>G [50, 54] και c.52-1G>A (rs886041353, ClinVar:280064) [49]. Αυτές οι παραλλαγές καταστρέφουν την κανονική θέση ματίσματος στο ιντρόνιο 2 και αναμένεται να προκαλέσουν μη φυσιολογικό μάτισμα του γονιδίου *SERPING1*.

Στην πρώτη βάση του ιντρονίου 3, οι Kalmár et al ανίχνευσαν την μετάλλαξη c.550+1G>A σε οικογένεια με C1-INH-HAE [50, 55] και την θεώρησαν ως παθογονική, καθώς επηρεάζει το νουκλεοτίδιο G στην 5' θέση ματίσματος. Στο δεύτερο νουκλεοτίδιο του ιντρονίου 3 έχει ανιχνευτεί η μετάλλαξη c.550+2T>C σε μία Ισπανική και μία Ελληνική οικογένεια με C1-INH-HAE. Η μετάλλαξη θεωρήθηκε ως παθογονική λόγω της θέσης της [56, 57]. Στο συντηρημένο δινουκλεοτίδιο AG στη 3' θέση ματίσματος στο ιντρόνιο 3 έχουν ανιχνευτεί οι μεταλλάξεις c.551-2delA [56], c.551-2A>G [49, 58] και c.551-1G>A [57] σε ασθενείς με C1-INH-HAE. Η λειτουργική μελέτη των μεταλλάξεων c.551-2delA και c.551-2A>G έδειξε ότι καταργείται η σωστή σύνδεση του εξωνίου 4 και οδηγούν σε παράλειψη του συγκεκριμένου εξωνίου.

Οι Colobran et al ανίχνευσαν την μετάλλαξη c.685+2T>A στο ιντρονίου 4 του γονιδίου *SERPING1* σε ένα οχτάχρονο κορίτσι με C1-INH-HAE και την οικογένεια της. Βάση λειτουργικών μελετών στο επίπεδο mRNA αποδείχθηκε ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη οδηγεί σε παράλειψη του εξωνίου 4 [59]. Το εξώνιο 4 αποτελείται από 135 bp, που αντιστοιχούν σε 45 κωδικόνια, η έλλειψη των οποίων δεν προκαλεί αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης. Επομένως το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο που υπολείπεται του εξωνίου 4 θα μπορούσε να παράγει μια πρωτεΐνη που στερείται 45 αμινοξέων. Τα επίπεδα του μεταλλαγμένου mRNA ήταν πολύ χαμηλά σε σχέση με το φυσιολογικό, γεγονός που υποδεικνυε ότι το μεταλλαγμένο mRNA υποβαλλόταν σε επεξεργασία με κάποιο από τα τρία μονοπάτια επιτήρησης. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας το βιοπληροφορικό εργαλείο RNAfold βρέθηκε ότι η δευτεροταγής δομής τροποποιείται. Αυτά τα δεδομένα συνάδουν με την αποικοδόμηση του μεταλλαγμένου mRNA μέσω της οδού no-go αποικοδόμηση (NGD), η οποία συνδέεται με δευτερεύοντα χαρακτηριστικά δομής. Η αλληλουχία του εξωνίου 4 περιλαμβάνει τρία δευτερεύοντα δομικά στοιχεία που εμπλέκονται σε εκτεταμένες επαφές με άλλα δευτερεύοντα στοιχεία δομής. Η απώλεια του εξωνίου 4 που δημιουργείται από τη μετάλλαξη c.685+2T>A φαίνεται να επηρεάζει το κινητό κεντρικό βρόχο, δηλαδή την περιοχή που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με πρωτεάσες-στόχους. Στην ίδια θέση του ιντρονίου, οι Pappalardo et al ανίχνευσαν τη μετάλλαξη c.685+2T>G σε μία οικογένεια με C1-INH-HAE, ενώ στην πρώτη βάση του ιντρονίου 4 ανίχνευσαν την μετάλλαξη c.685+1G>T [50, 54]. Στην 5' θέση ματίσματος στο ιντρόνιο 4, οι Gösswein et al ανίχνευσαν τη μετάλλαξη c.685+1G>A (rs113263597) σε 4 ασθενείς με C1-INH-HAE, οι οποίοι ανήκαν σε 2 διαφορετικές οικογένειες [49, 50].

Οι Roche et al ανίχνευσαν τη μετάλλαξη c.889+2T>C, στο δεύτερο νουκλεοτίδιο του ιντρονίου 5 σε μία οικογένεια ισπανικής καταγωγής και μελέτησαν την επίδραση της στην διαδικασία της μεταγραφής. Η ανάλυση RT-PCR έδειξε ότι η μετάλλαξη μειώνει ή καταργεί τη σωστή σύνδεση του εξωνίου 5 και οδηγεί σε μη φυσιολογικά αντίγραφα mRNA [50, 56]. Την κανονική θέση ματίσματος του ιντρονίου 5 επηρεάζει η μετάλλαξη c.889+1G>T, η οποία εντοπίζεται στο πρώτο νουκλεοτίδιο του ίδιου ιντρονίου [49, 50]. Την 3' θέση ματίσματος στο ιντρόνιο 5 επηρεάζουν οι μεταλλάξεις c.890-2A>G [50, 60] και c.890-1G>A [50, 52, 61].

Στο δινουκλεοτίδιο GT στη 5' θέση ματίσματος στο ιντρόνιο 6 έχει ανιχνευτεί η μετάλλαξη c.1029+1G>A [49, 50], ενώ το δινουκλεοτίδιο AG στη 3' θέση ματίσματος επηρεάζουν οι μεταλλάξεις c.1030-1G>A [57] και c.1030-1G>C [48, 49, 50]. Οι López-Lera et al μελέτησαν την επίδραση της μετάλλαξης c.1030-1G>C στο επίπεδο του mRNA και απέδειξαν την έλλειψη του εξωνίου 7 από

το παραγόμενο mRNA [62].

Στη πρώτη βάση του ιντρονίου 7 έχουν ανιχνευτεί δύο μεταλλάξεις, c.1249+1G>C [62] και c.1249+1G>A (rs112565881, ClinVar:3951) [49, 50]. Η λειτουργική μελέτη της μετάλλαξης c.1249+1G>C στο επίπεδο του mRNA από τους López-Lera et al έδειξε ότι η μετάλλαξη οδηγεί σε παράλειψη του προηγούμενου εξωνίου. Στο δεύτερο νουκλεοτίδιο του ιντρονίου έχουν ανιχνευτεί οι μεταλλάξεις c.1249+2T>A [50, 63] και c.1249+2delT [56]. Το μεταλλαγμένο T νουκλεοτίδιο αποτελεί μέρος του μοτίβου αναγνώρισης το οποίο είναι απαραίτητο για την εκτομή του ιντρονίου 7 κατά την επεξεργασία του mRNA C1-INH. Το δινουκλεοτίδιο GT στη 5' θέση ματίσματος εμπλέκεται στη δέσμευση των U1 μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών και με αυτό το τρόπο σχηματίζει μια θέση διάσπασης στο σωματίο συναρμογής [64]. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το διατηρημένο δινουκλεοτίδιο GT μειώνουν τον βαθμό σωστού ματίσματος και επίσης προάγουν την παρεκκλίνουσα ένωση εξωνίων [65]. Η λειτουργική ανάλυση με RT-PCR έδειξε ότι η μετάλλαξη c.1249+2delT μειώνει ή καταργεί τη σωστή σύνδεση του προηγούμενου εξωνίου και οδηγεί σε μη φυσιολογικά αντίγραφα mRNA. Αντίθετα, η μετάλλαξη c.1249+2T>A, η οποία ανιχνεύτηκε στην ίδια θέση από τους Kawachi et al, απέδωσε 50% μείωση του mRNA, αλλά δεν ανιχνεύτηκε μη φυσιολογικό mRNA, το οποίο υποδηλώνει ότι το αντίγραφο από το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ήταν ιδιαίτερα ασταθές. Το δινουκλεοτίδιο AG στη 3' θέση ματίσματος στο ιντρόνιο 7 επηρεάζουν οι μεταλλάξεις c.1250-1G>A [46] και c.1250-2A>G [49].

Πέρα από τις θέσεις των δινουκλεοτιδίων στις 5' και 3' θέσεις ματίσματος έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις και σε άλλες ιντρονικές θέσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως συντηρημένες και εξαιρετικά σημαντικές για τη διαδικασία της μεταγραφής. Στο τρίτο νουκλεοτίδιο του ιντρονίου 2 έχει ανιχνευτεί η μετάλλαξη c.51+3A>G σε τρεις οικογένειες με C1-INH-HAE [34, 54, 56, 62]. Η μετάλλαξη επηρεάζει μια θέση όπου συνήθως εντοπίζονται πουρίνες σε πρωτεύοντα, 57% A και 39% G, σύμφωνα με τους Senarathy et al [66]. Οι Duponchel et al και οι Lopez-Lera et al μελέτησαν την επίδραση της συγκεκριμένης μετάλλαξης στο επίπεδο του RNA και διεπίστωσαν ότι η μετάλλαξη προκαλεί την παράκαμψη του εξωνίου 2 και 3 στο παραγόμενο mRNA. Στην ίδια θέση στο ιντρόνιο 5, οι Johnsrud et al [67], ανίχνευσαν τη μετάλλαξη c.889+3A>T, η οποία οδηγεί σε έλλειψη του εξωνίου 5, διατηρώντας το πλαίσιο ανάγνωσης και κωδικοποιώντας μια πρωτεΐνη p.Asp229\_Ser296del που δεν διαθέτει κεντρικό τμήμα της συμπαγούς διπλωμένης περιοχής σερπίνης του C1-INH. Στο ιντρόνιο 6 έχει ανιχνευτεί η μετάλλαξη c.1029+3\_c.1029+6 del4bp σε δύο ασθενείς με C1-INH-HAE, οι οποίοι είναι μέλη της ίδιας οικογένειας [49].

Μεταλλάξεις σε ασθενείς με C1-INH-HAE έχουν ανιχνευτεί στο τέταρτο νουκλεοτίδιο του ιντρονίου 5 και του ιντρονίου 6, c.889+4delAGGGT [57] και c.1029+4delA [47].

Στο 85% των περιπτώσεων στη πέμπτη θέση των ιντρονίων στις θέσεις ματίσματος εντοπίζεται η βάση G [66]. Μεταλλάξεις στη θέση +5 πιστεύεται ότι μειώνουν σημαντικά τη σύνδεση στη 5' θέση ματίσματος με τη συμπληρωματική θέση στο σωματίδιο U1snRNP, το οποίο είναι ένα από τα πρώτα βήματα στη σύνθετη διαδικασία του ματίσματος του mRNA [68]. Κοινή συνέπεια των μεταλλάξεων στη 5' θέση ματίσματος είναι η παράλειψη του αμέσως προηγούμενου εξωνίου, ακολουθούμενο από την ενεργοποίηση παρεκκλίνουσας θέσης 5' ματίσματος και πλήρης διατήρηση ιντρονίων [69]. Εναλλακτικά, η μετάλλαξη στη συγκεκριμένη θέση μπορεί να οδηγήσει σε ποσοτικά, δηλαδή μειωμένη ποσότητα φυσιολογικού mRNA, ή ποιοτικά ελαττώματα, μέσω παράλειψης ενός εξωνίου, ενεργοποίηση μίας κρυφής θέσης ματίσματος, ή δημιουργία μίας νέας θέσης ματίσματος. Στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου *SERPING1* έχει ανιχνευτεί η μετάλλαξη c.51+5G>A, η οποία βάση λειτουργικών μελετών οδηγεί σε παράλειψη του εξωνίου 2 [34, 48, 50]. Οι Roche et al, ανίχνευσαν τις μεταλλάξεις c.550+5G>C και c.550+5G>A στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου *SERPING1* σε

τρεις ασθενείς με C1-INH-HAE, οι οποίες επηρεάζουν τις διατηρημένες γουανίνες στην 5' θέση ματίσματος στο συγκεκριμένο ιντρόνιο [50, 56]. Στην θέση +5 του ιντρονίου 7 του γονιδίου έχουν ανιχνευτεί οι μεταλλάξεις c.1249+5G>T [54, 58] και c.1249+5G>A [42, 58, 70]. Όπως αναφέρεται από τους Grodecká et al, η μετάλλαξη c.1249+5G>T πιθανότατα οδηγεί στην ενεργοποίηση κρυφών θέσεων ματίσματος και εισάγει ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης και ως εκ τούτου το μεταλλαγμένο mRNA αποικοδομείται μέσω ρυθμιστικών μηχανισμών [58]. Παρόλο που για τη μετάλλαξη c.1249+5G>A δεν κατέστη δυνατός ο προσδιορισμός του ελαττώματος που προκαλεί, η παράκαμψη του εξωνίου 7 και η διατήρηση του ιντρονίου 7 θα δημιουργούσε πρόωρο κωδικόνιο λήξης της μεταγραφής, καθιστώντας το μεταλλαγμένο μετάγραφο ως στόχο καταστροφής από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυττάρου, το οποίο αποδείχθηκε από τους Colobran et al [42].

Το νουκλεοτίδιο στη θέση +6 της 5' θέσης ματίσματος στο ιντρόνιο 2 επηρεάζει η μετάλλαξη c.51+6T>G, η οποία πιθανώς προκαλεί μια παρεκκλίνουσα πορεία μεταγραφής [62].

Το νουκλεοτίδιο -3 κοντά στην 3' θέση ματίσματος, στο οποίο εντοπίζεται συνήθως το πολύ συντηρημένο νουκλεοτίδιο C, επηρεάζουν οι μεταλλάξεις c.551-3C>G [49] στο ιντρόνιο 3 και c.686-3C>G [50, 56] στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1*. Ο προσδιορισμός της παθογονικότητας τους βασίστηκε στον εντοπισμό τους σε δύο οικογένειες με C1-INH-HAE. Η μετάλλαξη c.686-3C>G οδηγεί σε παράλειψη του αμέσως επόμενου εξωνίου, βάση λειτουργικών μελετών στο επίπεδο του mRNA [56].

Κοντά στη 3' θέση ματίσματος συνήθως εντοπίζεται ένα μοτίβο με πολυπυριμιδίνες (C ή T) 5-40 νουκλεοτιδίων μεταξύ της θέσης διακλάδωσης (branch point) και της 3' θέσης ματίσματος [71]. Σε έναν ασθενή με C1-INH-HAE πολωνικής καταγωγής ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη c.-22-19\_-22-4delAGGCTGGCTGGCTCCG στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *SERPING1*, η οποία χαρακτηρίζεται ως παθογονική από το βιοπληροφορικό εργαλείο MutationTaster [70]. Οι Pappalardo et al ανίχνευσαν την μετάλλαξη c.551-5T>A στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου *SERPING1* σε μία οικογένεια με C1-INH-HAE και την χαρακτήρισαν ως παθογονική λόγω της θέσης της κοντά στη 3' θέση ματίσματος [54]. Στην ίδια περιοχή του ιντρονίου 4 έχει ανιχνευτεί η μετάλλαξη c.686-12A>G σε τρεις οικογένειες με C1-INH-HAE [51, 54]. Η λειτουργική μελέτη αυτής της μετάλλαξης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι προκαλεί τροποποίηση στο παραγόμενο μεταγραφικό προϊόν [58]. Σε μία ασθενή με C1-INH-HAE ελληνικής καταγωγής έχει ανιχνευτεί η μετάλλαξη c.890-14C>G στο ιντρόνιο 5 του γονιδίου *SERPING1* [57]. Οι Kesim et al και Gösswein et al ανίχνευσαν την μετάλλαξη c.1250-13G>A στο ιντρόνιο 7 σε δύο οικογένειες τούρκικης και γερμανικής καταγωγής με C1-INH-HAE [49, 72]. Η μετάλλαξη μειώνει την πιθανότητα ματίσματος σε ποσοστό παρόμοιο με μία μετάλλαξη στις θέσεις ματίσματος.

Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευτεί μόνο τρεις μεταλλάξεις που βρίσκονται πιο βαθιά στο εσωτερικό του γονιδίου *SERPING1* και έχουν συσχετιστεί με το κληρονομικό αγγειοίδημα, με μόνο μία εξ αυτών να θεωρείται ως βαθιά ιντρονική μετάλλαξη (δηλαδή μετάλλαξη που βρίσκεται 100 bp από τα όρια ιντρονίων-εξωνίων). Οι Suffritti et al ανίχνευσαν τη μετάλλαξη c.685+31G>A (rs751335805) στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου σε ασθενή ιταλικής καταγωγής [73]. Στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* έχει ανιχνευτεί η μετάλλαξη c.1029+84G>A (rs118132731) σε δύο οικογένειες με κληρονομικό αγγειοίδημα [54, 74]. Η μετάλλαξη c.1029+84G>A υποθέτεται ότι επηρεάζει τη διαδικασία της μεταγραφής, καθώς και μεταλλάξεις πιο βαθιά μέσα στα ιντρόνια δύναται να επηρεάσουν το μάτισμα [75]. Τέλος, οι Hujoná et al ανίχνευσαν την πρώτη βαθιά ιντρονική μετάλλαξη στο γονίδιο *SERPING1*, c.1029+384A>G, σε δώδεκα ασθενείς με C1-INH-HAE οι οποίοι ανήκουν σε μία οικογένεια τσέχικης καταγωγής. Η βιοπληροφορική ανάλυση προέβλεψε ότι η μετάλλαξη οδηγεί στη δημιουργία μίας νέας 5' θέσης ματίσματος και επομένως οδηγεί στην ένταξη ενός

ψευδο-εξωνίου στο μεταγραφόμενο mRNA. Η είσοδος του ψευδο-εξωνίου οδηγεί στη δημιουργία ενός πρόωρου κωδικονίου τερματισμού και πιθανή καταστροφή του παραγόμενου mRNA από ελεγκτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, το οποίο θα μπορούσε δυνητικά να εξηγήσει τη μειωμένη ποσότητα της πρωτεΐνης. Η λειτουργική μελέτη που διεξήχθη με RT-PCR απέδειξε εν τέλει την άνωθεν πρόβλεψη [76].

Όπως σε πολλά άλλα γονίδια, οι κωδικοποιούσες περιοχές και τα όρια εξωνίων-ιντρονίων υπάγονται στη ρουτίνα για τη διάγνωση μεγάλου αριθμού νοσημάτων. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση μπορεί να οδηγήσει στην παράληψη μεγάλου αριθμού παθολογικών ιντρονικών μεταλλάξεων. Η συχνότητα των βαθιών ιντρονικών μεταλλάξεων, οι οποίες μπορεί να είναι ζωτικής σημασίας σε πολλούς ασθενείς που εξακολουθούν να μην έχουν μοριακή γενετική διάγνωση, θα μπορούσε να υποτιμηθεί [77]. Δυνητικά θα μπορούσε να είναι ένας από τους κυριότερους λόγους για τους οποίους το 9,2% (από 3,8 έως 17,9%) των ασθενών με C1-INH-HAE, η αιτιολογική μετάλλαξη στο γονίδιο *SERPING1* παραμένει άγνωστη, καθώς η τυπική εξέταση περιορίζεται στην αλληλούχηση των εξωνικών περιοχών και των ορίων εξωνίων-ιντρονίων του γονιδίου *SERPING1* [57, 78], το οποίο δείχνει ότι, σε μερικούς ασθενείς, η αιτιολογική μετάλλαξη που τροποποιεί την έκφραση της C1-INH μπορεί να βρίσκεται σε βαθιά ιντρονική περιοχή του γονιδίου.

### 2.3. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΝΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Τα ιντρόνια είναι ένα χαρακτηριστικό της ευκαρυωτικής εξέλιξης [79]. Ένα από τα καλύτερα παραδείγματα για τη κρίσιμότητα της ιντρονική λειτουργία στους ευκαρυώτες είναι η αύξηση της αφθονίας των πρωτεϊνών των γονιδίων που φέρουν ιντρόνια. Η δομή των ιντρονίων και των εξωνίων των ευκαρυωτικών γονιδίων έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία νέων γονιδίων [80], και η δυνατότητα εναλλακτικής επιλογής διαφορετικών συνδυασμών εξωνίων αποτέλεσε κρίσιμο παράγοντα για τη δημιουργία ποικιλομορφίας στην έκφραση σε πιο πολύπλοκους οργανισμούς [81].

Για πολλά χρόνια η σημασία της γονιδιωματικής αλληλουχίας συνδεόταν κυρίως με την ικανότητά της να κωδικοποιεί πρωτεΐνες και, ως εκ τούτου, οι ιντρονικές αλληλουχίες θεωρούνταν ως επί το πλείστον μη λειτουργικές. Τα ιντρόνια καλούνταν ως «junk DNA», καθώς απομακρύνονται από το ώριμο mRNA. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα τονίζουν την σημασία των ιντρονίων. Επιγραμματικά αναφέρονται τα παρακάτω. Έχει παρατηρηθεί μια αξιοσημείωτη διατήρηση πολλών ιντρονικών θέσεων, υπονοώντας ότι τουλάχιστον ορισμένα ιντρονικά χαρακτηριστικά υπόκεινται σε εξελικτικό περιορισμό [82, 83, 84]. Συντηρημένες θέσεις θεωρούνται οι αλληλουχίες ματίσματος, οι θέσεις σύνδεσης των ρυθμιστικών πρωτεϊνών και οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν RNA γονίδια [85]. Επιπρόσθετα, τα ιντρόνια έχουν αποδειχθεί ότι αυξάνουν την μεταγραφική αποτελεσματικότητα σε θηλαστικά [86], καθώς ο υποκινητής δρα σε συνδυασμό με τις περιοχές-ενισχυτές ματίσματος [87, 88]. Η διατήρηση ορισμένων ιντρονικών αλληλουχιών έγκειται στο γεγονός ότι από αυτές τις αλληλουχίες δύναται να προέρχονται τα περισσότερα μικρά πυρηνικά RNA (snoRNAs) [89] και τα micro RNAs (miRNAs). Επιπλέον, το εναλλακτικό μάτισμα αυξάνει την πρωτεϊνική ποικιλότητα δημιουργώντας πολλαπλές ισομορφές mRNA από ένα μόνο γονίδιο. Ένα μόριο pre-mRNA μπορεί να υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα μέσω παράλειψης εξωνίων, επιλογής διαφορετικής θέσης ματίσματος και διατήρησης ιντρονίων στο παραγόμενο ώριμο mRNA [90]. Τέλος, τα ιντρόνια περιέχουν πληθώρα αλληλουχιών παρόμοιων με τα συναφή μοτίβα των κανονικών θέσεων ματίσματος [91, 92] που καλούνται ως ψευδο-εξώνια ή ως κρυφές θέσεις ματίσματος. Σε σύγκριση με τα κανονικά εξώνια τα ψευδο-εξώνια τείνουν να έχουν μικρότερο αριθμό μοτίβων



που ενισχύουν το μάτισμα και περισσότερα μοτίβα καταστολής ματίσματος [93, 94, 95]. Αυτό που καθορίζει την προτίμηση για τις κανονικές θέσεις ματίσματος προκύπτει από το συνδυαστικό αποτέλεσμα πρωτεϊνών που συνδέονται με το pre-mRNA και είτε σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις του σωματίου συναρμογής είτε αναστέλλουν τη στρατολόγηση των συστατικών του σωματίου συναρμογής [96].

Οι μεταλλάξεις στις ιντρονικές περιοχές, είτε εντοπίζονται κοντά στις εξωνικές θέσεις είτε εντοπίζονται βαθιά στο εσωτερικό των ιντρονίων δύναται να προκαλέσουν προβλήματα στη διαδικασία της μεταγραφής. Οι μεταλλάξεις στις θέσεις κανονικού ματίσματος επηρεάζουν έντονα τις αλληλουχίες που ορίζουν τα όρια εξωνίων-ιντρονίων. Οι μεταλλάξεις σε αυτές τις θέσεις είναι πιθανό να μεταβάλουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του pre-mRNA και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην απομάκρυνση του εκάστοτε ιντρονίου και συνήθως οδηγούν σε παράλειψη ενός εξωνίου. Ωστόσο, εάν η θέση ματίσματος είναι αδύναμη και η μετάλλαξη αποκαλύψει μία κρυφή θέση ματίσματος, αυτή η εναλλακτική θέση μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εισαγωγή μέρους του ιντρονίου στο παραγόμενο mRNA ή στην απομάκρυνση ενός θραύσματος εξωνίου εάν η κρυφή θέση ματίσματος υπάρχει σε ιντρόνιο ή εξώνιο, αντίστοιχα [97]. Το αποτέλεσμα της μετάλλαξης στην κανονική θέση ματίσματος εξαρτάται από την ισχύ της θέσης ματίσματος, την ύπαρξη κρυφών θέσεων ματίσματος και την πυκνότητα ESS και ESE, ή δευτερεύουσες δομές που σχηματίζονται από το pre-mRNA.

Οι μεταλλάξεις στις βαθιές ιντρονικές θέσεις συνήθως έχουν ως αποτέλεσμα την προσθήκη ενός μέρους της αλληλουχίας του ιντρονίου, το ψευδο-εξώνιο, στο ώριμο mRNA. Συνήθως τέτοιου τύπου μεταλλάξεις δημιουργούν νέες μη κανονικές θέσεις ματίσματος που αναγνωρίζονται από το σωματίο συναρμογής και χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες κρυφές θέσεις ματίσματος. Η προσθήκη ενός ψευδο-εξωνίου θεωρείται μία από τις πλέον πιο συχνές αιτίες που οδηγούν στην εκδήλωση ενός νοσήματος [98]. Ο πιο κοινός μηχανισμός περιλαμβάνει μεταλλάξεις οι οποίες δημιουργούν μία νέα 5' θέση ματίσματος και ενεργοποιούν μία προϋπάρχουσα μη-κανονική 3' θέση ματίσματος. Πιο σπάνια θεωρείται η ύπαρξη μετάλλαξης που δημιουργεί μια νέα 3' θέση ματίσματος. Η εμφάνιση ενός ψευδο-εξωνίου τείνει να τροποποιεί το αναγνωστικό πλαίσιο εισάγοντας ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού (PTC) με αποτέλεσμα την παραγωγή μικρότερης πρωτεΐνης. Ωστόσο, η παρουσία του PTC οδηγεί σε ταχύτερη αποικοδόμηση mRNA κατά τη διάρκεια μιας προστατευτικής διαδικασίας που ονομάζεται διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (NMD) [99]. Η αποικοδόμηση του ελλειμματικού mRNA αποτρέπει την παρεκκλίνοια σύνθεση πρωτεϊνών [100]. Επιπρόσθετα, η δημιουργία ενός ενισχυτή ματίσματος μέσα σε μία ιντρονική περιοχή μπορεί να αποτελέσει ένα επαρκές στοιχείο για να προαγάγει την αναγνώριση από το σωματίο συναρμογής που οδηγεί στην ένταξη ενός ψευδο-εξωνίου. Εναλλακτικά, δύναται να προκληθεί η ένταξη ψευδο-εξωνίων με μεταλλάξεις που απενεργοποιούν κατασταλτικές αλληλουχίες ή δευτερεύουσες δομές [101, 102]. Οι περισσότερες βαθιές ιντρονικές μεταλλάξεις δεν έχουν καμία επίδραση στην κανονική θέση ματίσματος. Ωστόσο, ορισμένες μεταλλάξεις που δημιουργούν μια νέα θέση ματίσματος παρεμβαίνοντας στην αναγνώριση των φυσικών σημείων ματίσματος [103]. Οι γενετικές παραλλαγές δύναται να προκαλέσουν ασθένεια μέσω απενεργοποίησης γονιδίων RNA που κωδικοποιούνται από τα ιντρόνια [104, 105].

Η διαδικασία ματίσματος εξαρτάται επίσης από την παρουσία συγκεκριμένων αλληλουχιών: τη θέση διακλάδωσης (branch point) και τις αλληλουχίες της οδού πολυπυριμιδίνης που δεσμεύουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες που βοηθούν στον σχηματισμό του συμπλόκου συναρμογής. Οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στη θέση διακλάδωσης μπορεί να οδηγήσουν σε παράλειψη εξωνίου λόγω της δυσλειτουργίας των πρωτεϊνών σύνδεσης SF1 και U2 snRNP και ρήξη της

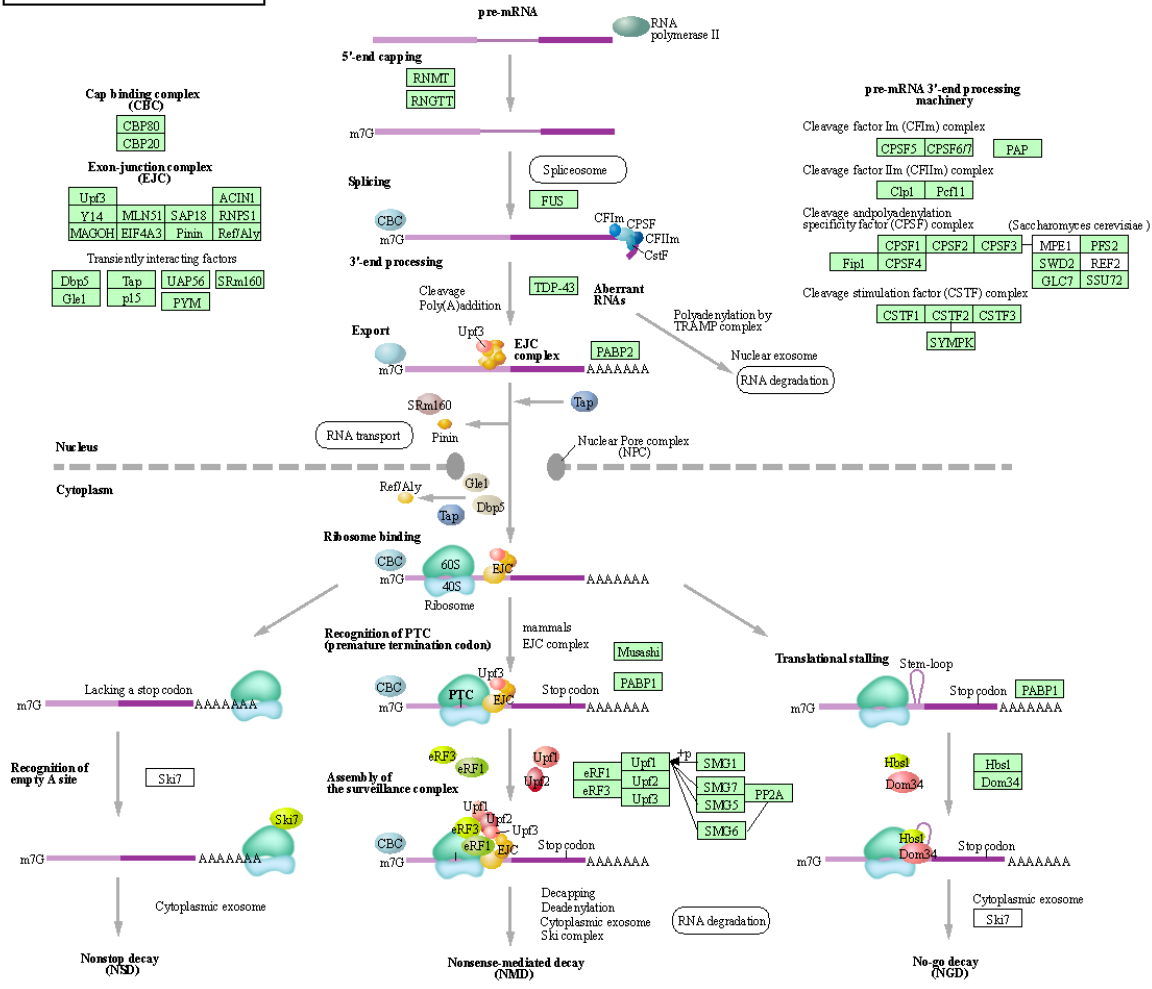
κανονικής 3' θέσης ματίσματος. Επίσης, οι μεταλλάξεις σε αυτή τη θέση μπορούν να προκαλέσουν διατήρηση μέρους του ιντρονίου εάν δημιουργούν νέα 3' θέση ματίσματος [106]. Η οδός πολυυριμιδίνης με αλληλουχία εμπλουτισμένη σε νουκλεοτίδια πυριμιδίνης βρίσκεται μεταξύ 5 και 40 bp από τη 3' θέση ματίσματος. Οι μεταλλάξεις σε αυτή την αλληλουχία πιθανότατα οδηγούν σε προβλήματα στη διαδικασία του ματίσματος [107]. Οι μεταλλάξεις και στις δύο αυτές θέσεις θεωρούνται σπάνιες και είναι δύσκολο να εντοπιστούν.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα για να μπορέσουν να αντιμετωπίσουν τα παρεκκλίνοντα από το κανονικό mRNA μετάγραφα έχουν αναπτύξει μία σειρά από ελεγκτικούς μηχανισμούς. Ωστόσο, τα μετάγραφα που δεν περιέχουν έντονες διαφορές από το κανονικό mRNA δεν μπορούν να διακριθούν τόσο εύκολα. Μερικά από αυτά τα mRNA, εάν μεταφραστούν, μπορούν να παράγουν παρεκκλίνουσες πρωτεΐνες που είναι επιζήμιες για το κύτταρο. Για την ελαχιστοποίηση αυτών των σφαλμάτων, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την παρακολούθηση των παραγόμενων mRNA καθώς μεταφράζονται και για την καταστροφή των μεταλλαγμένων μεταγράφων. Υπάρχουν τρεις οδοί παρακολούθησης mRNA: η διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (NMD), η αποικοδόμηση μη-τερματισμού (NSD) και η no-go αποικοδόμηση (NGD) (Εικόνα 6).

Η NMD στοχεύει ειδικά mRNA που περιέχουν ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού. Όλα τα κωδικόνια τερματισμού πρέπει αρχικά να αναγνωρίζονται από τους κανονικούς συντελεστές τερματισμού μετάφρασης eRF1 και eRF3. Υπάρχουν δύο βασικά μοντέλα που εξηγούν πώς τα μεταλλαγμένα μετάγραφα αναγνωρίζονται ως στόχοι. Το μοντέλο των συμπλεγμάτων εξωνίων (EJC) προτείνει ότι το EJC-ένα μεγάλο σύμπλεγμα πολλαπλών πρωτεϊνών που έχει δημιουργηθεί 20 με 24 βάσεις πριν από τη σύνδεση εξωνίων-ενεργεί ως ένα δεύτερο σήμα για την επισήμανση ενός κωδικονίου τερματισμού ως PTC [108, 109, 110, 111, 112, 113, 114]. Κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, τα ριβοσώματα σαρώνουν το mRNA και σταματούν σε ένα κωδικόνιο τερματισμού. Εάν υπάρχει EJC πριν του κωδικονίου τερματισμού, η πρωτεϊνική κινάση SMG1, το υπόστρωμά της Upr1, μια ATPase/ελικάση και οι παράγοντες απελευθέρωσης ευκαρυωτικών πολυπεπτιδίων eRF1 και eRF3 προσλαμβάνονται για να σχηματίσουν το σύμπλεγμα SURF στο mRNA. Η φωσφορυλίωση του UPF1 από το SMG1 οδηγεί στην πρόσληψη SMG5, SMG6 και SMG7 μέσω φωσφο-ειδικών αλληλεπιδράσεων [115]. Μετά την πρόσληψη, τα SMG5 και SMG7 προάγουν την αποσύνθεση RNA με τη στρατολόγηση παραγόντων, οδηγώντας στην έκθεση των άκρων μεταγραφής σε κυτταρικές εξωνουκλεάσες [116, 117]. Το δεύτερο μοντέλο για το NMD υποστηρίζει ότι η ασυνήθιστα μακριά 3' αμετάφραστη περιοχή πριν από ένα PTC δρα ως ένα δεύτερο σήμα. Η συσσώρευση UPF1 καθώς και άλλων ρυθμιστικών στοιχείων στο 3' UTR μεσολαβεί στην πρόσληψη άλλων παραγόντων NMD και στην έναρξη της αποσύνθεσης mRNA [118, 119].

Η NSD στοχεύει mRNA με έλλειψη κωδικονίου τερματισμού και η NGD στοχεύει το mRNA που περιέχει μια σειρά πιθανές αλληλουχίες παρεμπόδισης. Το μονοπάτι παρακολούθησης NGD υποβαθμίζει τα mRNA που περιέχουν ακινητοποιημένα ριβοσώματα [120]. Το NGD συμβαίνει όταν η επιμήκυνση της μετάφρασης παρεμποδίζεται από την παρουσία σταθερών ενδομοριακών ή διαμοριακών δομών RNA, ενζυματικής διάσπασης, χημικά κατεστραμμένων αλληλουχιών ή σπάνιων κωδικονίων [121, 122, 123]. Το NSD στοχεύει δύο τύπους mRNA χωρίς κωδικόνιο τερματισμού: mRNA χωρίς διακοπή, τα οποία περιέχουν αλληλουχίες πολύ (A) ουράς στο άκρο 3' και mRNAs χωρίς κωδικόνιο τερματισμού, που δεν έχουν αλληλουχίες πολύ (A) ουράς [124]. Τα μη διακοπτόμενα mRNA δημιουργούνται με πρόωρη πολυαδενυλίωση, ενώ μια ενδονουκλεολυτική διάσπαση στην περιοχή κωδικοποίησης οδηγεί σε mRNAs χωρίς κωδικόνιο τερματισμού.

mRNA SURVEILLANCE PATHWAY



Εικόνα 6: Οι τρεις οδοί παρακολούθησης mRNA: η διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση (NMD), η αποικοδόμηση μη-τερματισμού (NSD) και η no-go αποικοδόμηση (NGD).

### 3. FXII-HAE

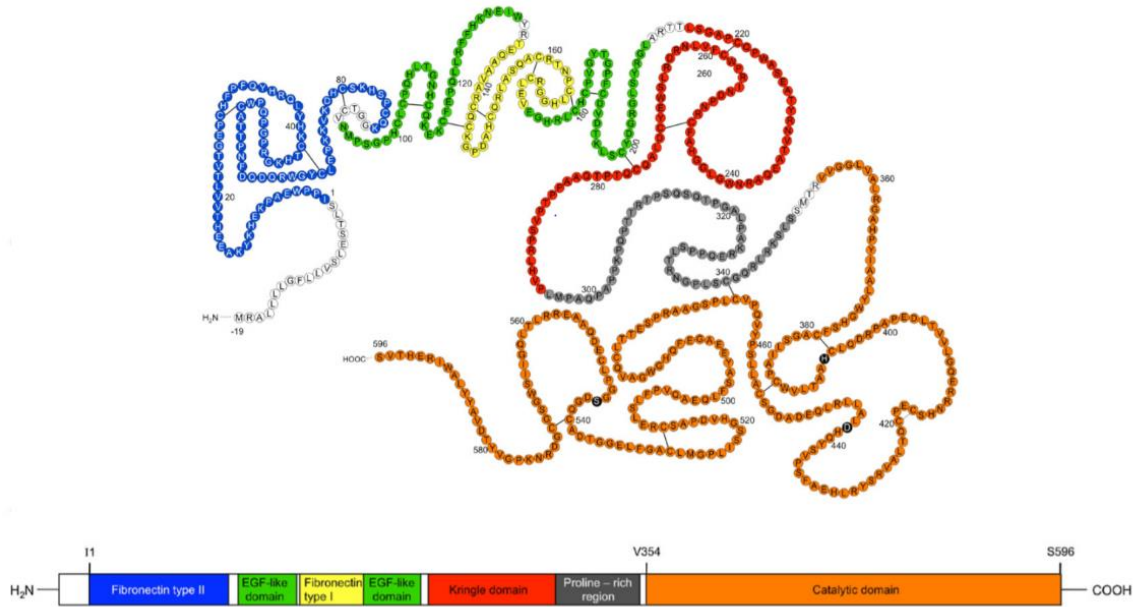
#### 3.1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ FXII-HAE

Το 1986, οι Warin et al [125], ανέφεραν δύο αδελφές που παρουσίασαν σοβαρά επεισόδια αγγειοιδήματος μετά την λήψη αντισυλληπτικών και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους. Δεκατέσσερα χρόνια αργότερα, το 2000, ταυτόχρονα οι Bork et al [126] και οι Binkley και Davis [127], περιέγραψαν γυναίκες ασθενείς με παρόμοια κλινική εικόνα με το C1-INH-HAE, αλλά με φυσιολογικό C1-INH, και χωρίς παθογόνο μετάλλαξη στο γονίδιο *SERPING1*. Σαν κύριο αίτιο για τα επεισόδια αγγειοιδήματος αποτέλεσαν τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων, δηλαδή τα αντισυλληπτικά, η θεραπεία υποκατάστασης ορμονών και η εγκυμοσύνη.

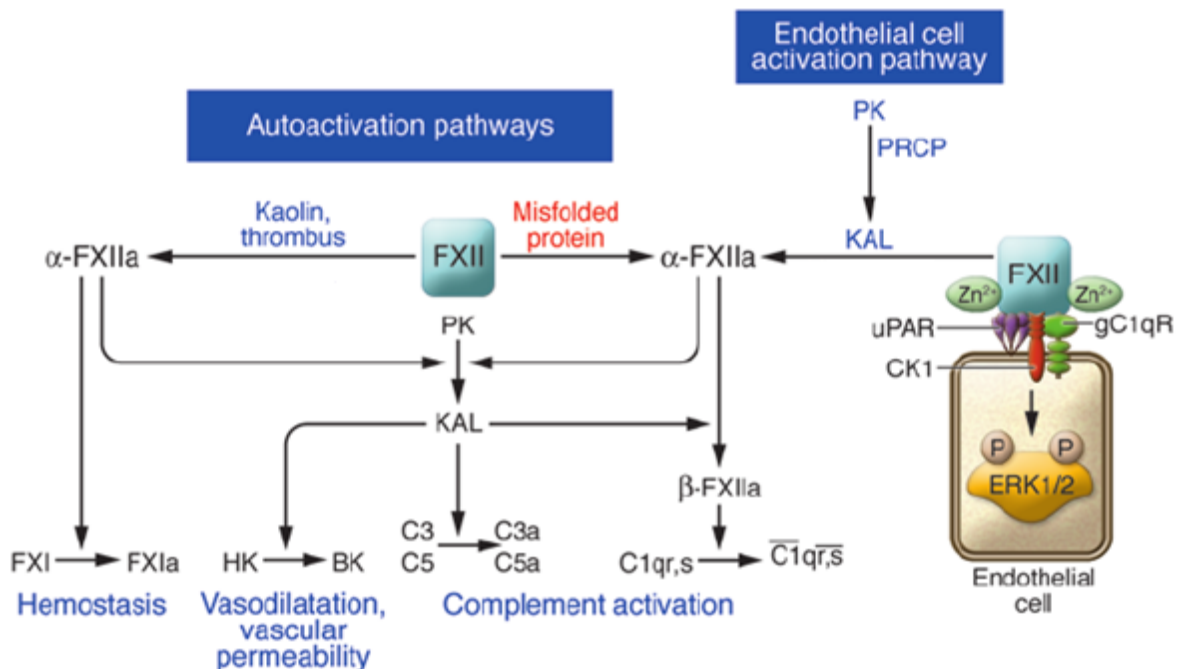
Ακολουθώντας μια λειτουργική υπόθεση ότι το γενετικό υπόβαθρο του νοσήματος μπορεί να εντοπίζεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα πήξης διερευνήθηκε το γονίδιο *F12* (Ensembl: ENSG00000131187, OMIM: 610619). Το γονίδιο *F12* έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 5 (5q33-qter) και περιλαμβάνει 13 ιντρόνια και 14 εξώνια που καλύπτουν 12 kb [128]. Έχουν περιγραφεί αρκετές μεταλλάξεις απώλειας-λειτουργίας στο γονίδιο *F12* που σχετίζονται με ανεπάρκεια FXII (νόσος του Hageman, OMIM: 234000).

Το γονίδιο *F12* κωδικοποιεί τον παράγοντα πήξης XII, μια πρωτεάση σερίνης που κυκλοφορεί στο ανθρώπινο πλάσμα ως απλή αλυσίδα αδρανούς ζυμογόνου σε συγκέντρωση περίπου 30 μg /ml. Αυτό το ζυμογόνο μονής αλυσίδας μετατρέπεται σε πρωτεάση σερίνης δύο αλυσίδων με βαριά αλυσίδα (άλφα-παράγοντας XIIa) και ελαφριά αλυσίδα. Η βαριά αλυσίδα περιέχει δύο τομείς τύπου ινωδονεκτίνης, δύο τομείς τύπου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), έναν τομέα kringle και έναν πλούσιο σε προλίνη τομέα, ενώ η ελαφριά αλυσίδα περιέχει μόνο μια καταλυτική περιοχή (**Εικόνα 7**) [129]

Υπάρχουν δύο οδοί για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης FXII: η αυτόματη ενεργοποίηση κατά την έκθεση σε αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες και η πρωτεολυτική ενεργοποίηση σε κυτταρικές μεμβράνες. Η FXII ενεργοποιείται αυτόματα σε μια τεχνητή ή βιολογική επιφάνεια, όπως καολίνη ή θρόμβος για ενεργοποίηση της FXII στη α-FXIIa. Η α-FXIIa στη συνέχεια ενεργοποιεί το FXI στο FXIa για να ξεκινήσει αιμόσταση και ενεργοποιεί την προκαλλικρεΐνη (PK) για να σχηματίσει καλλικρεΐνη πλάσματος (KAL). Η KAL διασπά το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (HMWK) για να απελευθερώσει τη βραδυκινίνη (BK), η οποία προκαλεί αγγειοδιαστολή και αγγειακή διαπερατότητα. Η KAL ενεργοποιεί επίσης το σύστημα συμπληρώματος ενεργοποιώντας απευθείας τα συστατικά συμπληρώματος C3 και C5 και διασπώντας τη α-FXIIa για να σχηματίσει β-FXIIa, το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί το μακρομοριακό C1q, s σύμπλοκο σε ενζυματικά ενεργό C1r και C1s. Οι Maas et al [130] πρότειναν έναν δεύτερο μηχανισμό αυτόματης ενεργοποίησης FXII, ο οποίος συμβαίνει κατά την έκθεση της FXII σε συσσωματώματα λανθασμένων πρωτεϊνών και αυτή η ενεργοποίηση έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση PK χωρίς ενεργοποίηση FXI. Μια δεύτερη διαδρομή για την ενεργοποίηση της FXII συμβαίνει σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Το PK που συνδέεται με το HK σε ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιείται στο KAL από την πρωτεάση σερίνης προλυλοκαρβοξυπεπτιδάση (PRCP). Στη συνέχεια, το KAL ενεργοποιεί τη FXII σε α-FXIIa. Η FXII δεσμεύεται επίσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία ιόντων ψευδαργύρου και όταν δεσμεύεται διεγείρει τη φωσφορυλίωση ERK1/2 (**Εικόνα 8**) [131].



**Εικόνα 7:** Αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης FXII: η FXII χωρίζεται σε διάφορους τομείς. Η επάνω δομή: αλληλουχία αμινοξέων; η κάτω δομή: γραμμικό διάγραμμα των περιοχών της πρωτεΐνης που χωρίζονται βάση χρώματος. Αμινοξέα -19-1: οδηγό πεπτιδίο, 1-88: περιοχή ινωδονεκτίνης τύπου II, 94-131: περιοχή τύπου EGF, 133-173: περιοχή τύπου ινωδονεκτίνης I, 174-210: περιοχή τύπου EGF, 215-295: περιοχή kringle, 296-349: περιοχή πλούσια σε προλίνη, 354-596: καταλυτικός τομέας ή ελαφριά αλυσίδα. Τα αμινοξέα 1-353 είναι η βαριά αλυσίδα [132].



**Εικόνα 8:** Αναπαράσταση των δύο οδών ενεργοποίησης της πρωτεΐνης FXII: της αυτόματης ενεργοποίησης κατά την έκθεση σε αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες και τη πρωτεολυτική ενεργοποίηση σε κυτταρικές μεμβράνες [131].

Ως αποτέλεσμα της υπόθεσης ότι οι αιτιατές μεταλλάξεις βρίσκονται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη FXII, το 2006, ο Dewald και ο Bork συνέδεσαν αυτό το είδος αγγειοσιδήματος με το γονίδιο *F12* [133]. Η αλληλούχηση των εξωνικών περιοχών του γονιδίου και των θέσεων σύνδεσης εξωνίων-ιντρονίων οδήγησε στην ανίχνευση δύο σημειακών μεταλλάξεων στην ίδια θέση του εξωνίου 9 του γονιδίου *F12* σε 20 ασθενείς με nC1-INH-HAE που ανήκαν σε 5 γερμανικές οικογένειες. Και οι δύο μεταλλάξεις βρίσκονται στη δεύτερη θέση του κωδικονίου (ACG) που κωδικοποιεί το αμινοξύ 328 της ώριμης πρωτεΐνης, ενός υπολείμματος θρεονίνης. Η μία μετάλλαξη οδηγεί σε υποκατάσταση θρεονίνης-λυσίνης (p.Thr328Lys) και η άλλη σε υποκατάσταση θρεονίνης-αργινίνης (p.Thr328Arg). Οι δύο μεταλλάξεις, c.983C>A (p.Thr328Lys) και c.983C>G (p.Thr328Arg), ανιχνεύτηκαν σε ετερόζυγη μορφή σε όλους τους ασθενείς. Δύο γυναίκες και οκτώ άνδρες, μέλη των παραπάνω οικογενειών, φέρουν την μετάλλαξη c.983C>A, αλλά δεν έχουν βιώσει επεισόδια αγγειοσιδήματος, το οποίο υποδεικνύει την μειωμένη διεισδυτικότητα και τη φύλο-περιορισμένη εκδήλωση του νοσήματος. Την ίδια χρονιά, η μετάλλαξη c.983C>A (p.Thr328Lys) στο γονίδιο *F12* ανιχνεύτηκε σε μία γαλλική οικογένεια, η οποία μοιράζεται τον ίδιο απλότυπο με τις πέντε γερμανικές οικογένειες, που υποδεικνύει την ύπαρξη ενός κοινού Ευρωπαϊκού προγόνου από τον οποίο προήλθε η μετάλλαξη [134]. Εντοπίζονται στην πλούσια σε προλίνη περιοχή της πρωτεΐνης FXII, το οποίο βρίσκεται κοντά στην καταλυτική περιοχή και σε μία από τις τρεις θέσεις σύνδεσης με την επιφάνεια [135].

Το 2011, μια νέα μετάλλαξη, μία έλλειψη 72 bp (c.971\_1018+24del72), ανιχνεύτηκε σε 3 μέλη μιας οικογένειας τούρκικης καταγωγής, οι οποίοι διέμεναν στη Γερμανία. Η οικογένεια περιλάμβανε 2 αδελφές με nC1-INH-HAE και τον ασυμπτωματικό πατέρα τους [136]. Το 2014, εντοπίστηκε μία ακόμα τούρκικη οικογένεια, με δύο γυναίκες με FXII-HAE, με την ίδια 72-bp έλλειψη, η οποία παρουσίαζε τον ίδιο απλότυπο, υποστηρίζοντας έντονα μια κοινή προέλευση αυτής της μετάλλαξης [137]. Η μελέτη του DNA και του mRNA στις τέσσερις γυναίκες με FXII-HAE από τις δύο οικογένειες τούρκικης καταγωγής έδειξε ότι η έλλειψη των 72 bp (c.971\_1018+24del72), η οποία ξεκινάει από το εξώνιο 9 και επεκτείνεται μέχρι το ιντρόνιο 9 του γονιδίου *F12* οδηγεί στην απώλεια του 3'-άκρου του εξωνίου 9 και του 5'-άκρου του ιντρονίου 9. Η έλλειψη ξεκινάει στο κωδικόνιο c.971A (κωδικοποιεί το αμινοξύ p.Lys324) στο εξώνιο 9 και τελειώνει 24 bp μετά την εκκίνηση του ιντρονίου 9. Η έλλειψη εντοπίστηκε στην περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πλούσια σε προλίνη περιοχή της πρωτεΐνης FXII, η οποία περιλαμβάνει τα αμινοξέα 315 έως 368. Η μετάλλαξη οδηγεί στην απώλεια της θέσης ματίσματος στο εξώνιο 9, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση του ιντρονίου 9, εκτός από τα πρώτα 24 νουκλεοτίδια που αφαιρέθηκαν με την έλλειψη, στο μεταγραφικό mRNA και στη μεταφραζόμενη πρωτεΐνη. Η συνέπεια της έλλειψης είναι μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη FXII χωρίς τα 16 αμινοξέα p.Lys324 έως p.Gly339, τα οποία κωδικοποιούνται από το 3' άκρο του εξωνίου 9 και την προσθήκη 27 αμινοξέων που κωδικοποιούνται από τα 81 νουκλεοτίδια του ιντρονίου 9 μεταξύ των p.Pro323 και p.Ala340. Έτσι, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη FXII είναι μακρύτερη κατά 11 αμινοξέα στην πλούσια σε προλίνη περιοχή. Ωστόσο, ο καταλυτικός τομέας και η θέση διάσπασης ενεργοποίησης μεταξύ των κωδικονίων p.Arg372 και p.Val373 δεν τροποποιείται, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της φυσιολογικής δράσης πήξης της FXII [137]. Το 2017, η έλλειψη c.971\_1018+24del72 στο γονίδιο *F12* ανιχνεύτηκε σε έναν ασθενή από την Βραζιλία με καυκάσια και αφρικανική καταγωγή [138].

Το 2013, σε μία οικογένεια ουγγρικής καταγωγής ανιχνεύτηκε ένας διπλασιασμός 18 bp (c.892\_909dup) που οδηγεί στην επανάληψη έξι αμινοξέων στην ίδια περιοχή του παράγοντα XII στην οποία περιεγράφηκαν οι υπόλοιπες μεταλλάξεις [139]. Η υπό διερεύνηση οικογένεια αποτελούνταν από μία 37χρονη γυναίκα με υποτροπιάζον αγγειοσίδημα, το οποίο συμπεριλάμβανε

πρήξιμο στο πρόσωπο και το φάρυγγα, και την κόρη της, η οποία είχε ένα μόνο επεισόδιο οιδήματος στο πρόσωπο σε ηλικία οκτώ ετών. Η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε στον πατέρα, στον θείο και στην γιαγιά της ασθενούς που δεν είχαν εμφανίσει κανένα επεισόδιο αγγειοοιδήματος κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Η λειτουργική επίδραση αυτής της νέας μετάλλαξης δεν είναι εμφανής, καθώς η πηκτική δράση της FXII ήταν φυσιολογική και στους δύο φορείς, δείχνοντας ότι το c.892\_909dup δεν μεταβάλλει τη δραστηριότητα της πήξης. Επιπρόσθετα, η ύπαρξη της μετάλλαξης σε τρεις φορείς χωρίς την ταυτόχρονη εκδήλωση συμπτωματολογίας υποδεικνύει ότι ακόμη και αν η αναγνωρισμένη μετάλλαξη είναι παθογόνος, περαιτέρω γενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την εμφάνιση επεισοδίων.

Οι τέσσερις μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευτεί μέχρι σήμερα εντοπίζονται στην πλούσια σε προλίνη περιοχή της πρωτεΐνης FXII.

Η μετάλλαξη c.983C>A (p.Thr328Lys) είναι η πιο συχνά ανιχνεύσιμη σε σχέση με τις υπόλοιπες τρεις παθογονικές μεταλλάξεις οι οποίες έχουν ανιχνευτεί στο γονίδιο *F12*, παρόλα αυτά παρουσιάζει μειωμένη διεισδυτικότητα, καθώς έχει ανιχνευτεί σε άνδρες και γυναίκες που δεν έχουν εκδηλώσει επεισόδια αγγειοοιδήματος [140, 141]. Περισσότερο από το 90% των ανδρών φορέων είναι ασυμπτωματικοί σε σύγκριση με το 40% των γυναικών [142]. Συνολικά, η μετάλλαξη c.983C>A (p.Thr328Lys) έχει ανιχνευτεί σε 400 γυναίκες και 131 άνδρες, οι οποίοι ανήκουν σε 168 οικογένειες, από τους οποίους 66 γυναίκες και 93 άνδρες ήταν ασυμπτωματικοί. Οι φορείς της μετάλλαξης έχουν κυρίως ευρωπαϊκή καταγωγή (Ισπανία [143, 144, 145, 146, 147], Ιταλία [148, 149, 150, 151, 152] Γαλλία [134, 147, 153, 154, 155], Γερμανία [133], Λουξεμβούργο [156]), αλλά έχει εντοπιστεί και μεγάλος αριθμός οικογενειών με καταγωγή από τη Βραζιλία [157, 158, 159, 160, 161], μία οικογένεια με καταγωγή από την Αυστραλία [162] και τρεις οικογένειες αραβικής καταγωγής [163, 164]. Η πλειονότητα των φορέων της μετάλλαξης είναι ετερόζυγοι, με μόνη εξαίρεση 2 ασθενών, μίας γυναίκας και ενός άνδρα με καταγωγή από την Βραζιλία, οι οποίοι είναι ομόζυγοι για την μετάλλαξη και παρουσιάζουν πιο βαριά συμπτωματολογία [160]. Οι αναλύσεις απλοτύπου των ασθενών με FXII-HAE και την μετάλλαξη c.983C>A (p.Thr328Lys) δείχνουν την ύπαρξη ενός κοινού προγόνου από τον οποίο προήλθε η συγκεκριμένη μετάλλαξη τόσο ανάμεσα στον ευρωπαϊκό όσο και στο βραζιλιάνικο πληθυσμό. Ο κοινός αυτός πρόγονος πιθανότατα προέρχεται από τον κεντροευρωπαϊκό πληθυσμό και χρονολογείται γύρω στον 11<sup>ο</sup> αιώνα. Πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι ο βραζιλιάνικος πληθυσμός αποτελεί ένα μείγμα γηγενής, ευρωπαϊκής και αφρικανικής καταγωγής. Ωστόσο, μελέτες υποστηρίζουν ότι η ευρωπαϊκή καταγωγή είναι το κυρίαρχο φαινόμενο για το 60,6% έως 77,7% [165], το οποίο μπορεί να εξηγήσει την ύπαρξη ενός κοινού προγόνου με τους Ιταλούς, Γερμανούς, Ισπανούς και Γάλλους.

Επιπρόσθετα, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία δύο ακόμα μεταλλάξεις στο γονίδιο *F12*, c.1681-1G>A (ιντρόνιο 13) και c.1027G>C (εξώνιο 10), σε δύο περιπτώσεις ιδιοπαθούς μη ισταμινεργικού αγγειοοιδήματος (InH-AAE) [166]. Αν και τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να υποδηλώνουν μεταλλάξεις με «επικερδή» λειτουργικότητα (gain of function mutation) σε ασθενείς με FXII-HAE, και οι δύο από αυτές τις μεταλλάξεις έχουν προηγουμένως εντοπιστεί σε συσχέτιση με ανεπάρκεια της πρωτεΐνης FXII. Πιο πρόσφατα, οι Hofman et al, ανίχνευσαν μία μετάλλαξη στο γονίδιο *F12*, c.859T>A (p.Trp268Arg), η οποία δεν σχετίζεται με το κληρονομικό αγγειοοίδημα. Οι φορείς της μετάλλαξης αυτής αντιμετωπίζουν εξάνθημα από κνίδωση, αρθραλγία, πυρετό και κόπωση. Η μετάλλαξη c.859T>A επηρεάζει τη διαμόρφωση πρωτεΐνης FXII και την έκθεση του βρόχου ενεργοποίησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική αυτόματη ενεργοποίηση και χαμηλού βαθμού έκκριση ενεργοποιημένου FXII [167].

Τέλος, ο πολυμορφισμός c.-46C>T στο γονίδιο *F12* (rs1801020) αναγνωρίστηκε ως

τροποποιητής του κλινικού φαινοτύπου του C1-INH-HAE. Αυτός ο πολυμορφισμός βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *F12*, τέσσερα νουκλεοτίδια πριν από το κωδικόνιο έναρξης, δημιουργώντας ένα νέο κωδικόνιο έναρξης για τη μεταγραφή του mRNA και μια μετατόπιση πλαισίου που παράγει μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Το αλληλόμορφο T καταστρέφει την αλληλουχία Kozak (GCCAGCCATGG) που σηματοδοτεί την έναρξης μετάφρασης και αποτρέπει τη σωστή αναγνώριση του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης [168]. Λόγω της επιζήμιας επίδρασής του πολυμορφισμού στη μετάφραση, ο c.-4T>C έχει αποδειχθεί ότι δρα ως τροποποιητής γενετικών νοσημάτων επηρεάζοντας τα επίπεδα FXII και FXIIa στο αιμοστατική παθολογία και τη στεφανιαία νόσο [169, 170, 171, 172, 173, 174, 175]. Οι φορείς του πολυμορφισμού εμφάνισαν σημαντικά καθυστερημένη έναρξη της νόσου και δεν είχαν την ανάγκη μακροχρόνιας θεραπείας [57]. Ενώ έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη διεισδυτικότητα του C1-INH-HAE [176, 177], καθώς το αλληλόμορφο C μπορεί να είναι προστατευτικό, καθώς το αλληλόμορφο T και ο γονότυπος TT εμφανίζεται μεταξύ των συμπτωματικών ασθενών με C1-INH-HAE.

### 3.2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ FXII-HAE

Μετά την ανακάλυψη των τεσσάρων παθογονικών μεταλλάξεων, προτάθηκε ότι προσδίδουν μια πιθανή αύξηση της λειτουργίας του FXII που οδηγεί σε αύξηση της ενεργοποίησης του συστήματος επαφών και συνεπώς μπορεί να προκαλέσει αυξημένο σχηματισμό βραδυκινίνης. Οι μετρήσεις δραστηριότητας αμιδολυτικής και κινινογενάσης έχουν δείξει αυξημένη δραστηριότητα του γονιδίου *F12* και αυξημένη παραγωγή βραδυκινίνης σε άτομα που φέρουν την μετάλλαξη c.983C>A (p.Thr328Lys) σε ετερόζυγη κατάσταση, και έτσι αυτή η μετάλλαξη έχει θεωρηθεί ως μετάλλαξη με επικερδή λειτουργικότητα. Η αυξημένη βιοδραστηριότητα της FXII οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα παραγωγής καλλικρεΐνης μέσω αποκοπής πλάσματος προ-καλλικρεΐνη η οποία, με τη σειρά της, αυξάνει την ενεργοποίηση της FXII μέσω ενός βρόχου θετικής ανατροφοδότησης. Το ενεργοποιημένο FXII παράγει βραδυκινίνη από κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους, το οποίο είναι ένας από τους πιο ισχυρούς μεσολαβητές της αγγειοδιαστολής και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη αγγειοσιδήματος [150]. Στην πραγματικότητα, οι ασθενείς με FXII-HAE που είναι φορείς της μετάλλαξης c.983C>A (p.Thr328Lys) έχουν αυξημένη αμιδολυτική δραστηριότητα FXII, αλλά με φυσιολογικά επίπεδα πρωτεΐνης του πλάσματος [134]. Αντιθέτως, οι Bork et al [178] έδειξαν ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των ασθενών με FXII-HAE και υγιών ούτε στην επιφανειακή ενεργοποίηση της FXII από διοξειδίο του πυριτίου ούτε σε δραστηριότητα όμοια με τη καλλικρεΐνη, υποδεικνύοντας ότι η μετάλλαξη c.983C>A (p.Thr328Lys) δεν προκαλεί αυξημένη δραστηριότητα. Έτσι, ο ρόλος των μεταλλάξεων του γονιδίου *F12* και η υποκείμενη παθοφυσιολογία του νοσήματος παρέμεινε ελάχιστα κατανοητή. Παρόλα αυτά, η ανταπόκριση ορισμένων ασθενών σε ανταγωνιστή υποδοχέα βραδυκινίνης (icatibant) κατά τη διάρκεια επεισοδίων αγγειοσιδήματος υποστηρίζει την υπόθεση ότι εμπλέκεται η δυσλειτουργία της οδού επαφής, με την πρωταρχική μεσολαβητή να είναι η βραδυκινίνη [179].

Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη της λειτουργίας της πλούσιας σε προλίνη περιοχής, όπου εντοπίζονται όλες οι μεταλλάξεις του γονιδίου *F12* που προκαλούν FXII-HAE. Η πλούσια σε προλίνη περιοχή συνδέει τους επιφανειακούς δεσμικούς τομείς του FXII με τον τομέα πρωτεάσης του. Το αμινοξύ 309 θρεονίνης είναι στόχος γλυκοζυλίωσης και εμφανίζει παρεκκλίνουσα γλυκοζυλίωση στο p.Thr328Lys και p.Thr328Arg. Ως αποτέλεσμα, η πλούσια σε προλίνη περιοχή είναι λιγότερο αρνητικά φορτισμένη και αναπτύσσει αυξημένη ικανότητα για αυθόρμητη ενεργοποίηση της θειικής δεξτράνης, που μπορεί να ενεργοποιήσει το σύστημα επαφής. Επίσης,



οι μεταλλάξεις c.983C>A (p.Thr328Lys), c.983C>G (p.Thr328Arg) και c.971\_1018+24del72 εισάγουν μία ή περισσότερες θέσεις διάσπασης στην πρωτεΐνη FXII. Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης FXII σε μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια ή σε ενδοθηλιακά κύτταρα απαιτεί διάσπαση από PK [180], οι θέσεις διάσπασης που εισάγονται από τις μεταλλάξεις είναι μη ευαίσθητες στη PK [181], υποδηλώνοντας ότι ένα άλλο ένζυμο εμπλέκεται στον μηχανισμό παραγωγής της βραδυκινίνης κατά τη διάρκεια των επεισοδίων αγγειοιδήματος στο FXII-HAE. Περαιτέρω μελέτες για τις μεταλλάξεις αποκάλυψαν ότι οι νέες θέσεις διάσπασης ενισχύουν το ρυθμό ενεργοποίησης του μεταλλαγμένου FXII από τη πλασμίνη, καθιστώντας το C1-INH αναποτελεσματικό στην πρόληψη της υπερβολικής παραγωγής βραδυκινίνης [181, 182].

Μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταγραφή του γονιδίου *F12* ρυθμίζεται από οιστρογόνα [183]. Στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *F12* εντοπίζεται το στοιχείο απόκρισης στα οιστρογόνα που συμβάλλει στην αύξηση της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια καταστάσεων αύξησης των οιστρογόνων [184, 185]. Συνολικά, γυναίκες με αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων και μετάλλαξη στο γονίδιο *F12* έχουν αυξημένα επίπεδα του παράγοντα XII [186, 187]. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί και άνδρες φορείς της μετάλλαξης που παρουσιάζουν επεισόδια αγγειοιδήματος. Στους συγκεκριμένους άνδρες τα επεισόδια είναι λιγότερο σοβαρά και συχνά, ενώ η μέση ηλικία έναρξης είναι μεγαλύτερη από αυτή των γυναικών [153].

Οι ασθενείς με FXII-HAE παρουσιάζουν υψηλή διακύμανση των συμπτωμάτων ως προς τη συχνότητα και τη σοβαρότητα τους, ακόμη και μεταξύ των μελών της ίδιας οικογένειας [147]. Μέχρι πρόσφατα, δεν υπήρχε εξήγηση για αυτήν την ακραία μεταβλητότητα, η οποία φαίνεται ακόμα και στο ίδιο άτομο με την πάροδο του χρόνου. Εκτός από τη γενετική βάση του κληρονομικού αγγειοιδήματος, ο υπερβολικός σχηματισμός κινίνης, σε συνδυασμό με μειωμένο καταβολισμό της, φαίνεται να έχει κεντρικό ρόλο [147, 188, 189]. Ωστόσο, τα επίπεδα δεν φαίνεται να επαρκούν για τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών φαινοτύπων, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η δραστηριότητα των ενζύμων αποικοδόμησης κινίνης οδηγούν σε διαφορετικές φαινοτυπικές εκδηλώσεις της νόσου. Υποστηρίζοντας περαιτέρω αυτήν την ιδέα, οι Charignon et al [147] εντόπισαν μία συσχέτιση μεταξύ του σοβαρού φαινοτύπου του FXII-HAE και του μειωμένου καταβολισμού της κινίνης και της μειωμένης δραστηριότητας CPN (καρβοξυπεπτιδάση N) και ACE (μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης).

Όσον αφορά την πιθανή γενετική επίδραση στον καταβολισμό της κινίνης, ο Duan και ο Binkley [149] πρότειναν την εισαγωγή/έλλειψη του πολυμορφισμού του *ACE* [190] και τον APP-ρυθμιστικό πολυμορφισμό, *XPNPEP2* c-2399, που μπορεί να εμπλακεί στη μειωμένη δραστηριότητα APP (αμινοπεπτιδάσης P). Η ανίχνευση του αλληλομόρφου που σχετίζονται με χαμηλό ACE στα επίπεδα ορού και του αλληλομόρφου που σχετίζεται με χαμηλή δραστηριότητα APP στον ορό τριών συμπτωματικών γυναικών από την ίδια οικογένεια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αυτός ο γενετικός συνδυασμός μπορεί να συμβάλει στην έκφραση της νόσου σε φορείς της μετάλλαξης στο γονίδιο *F12*. Η APP και η ACE είναι υπεύθυνα ένζυμα για την υποβάθμιση της βραδυκινίνης. Παρόλα αυτά, η ερευνητική εργασία των Piñero-Saavedra et al [143] δεν επιβεβαίωσε την υπόθεση των Duan και Binkley [149], καθώς δεν εντόπισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή της εισαγωγής/έλλειψης του πολυμορφισμού *ACE* ή του APP-ρυθμιστικού πολυμορφισμού, που αξιολογήθηκαν σε συνδυασμό και ξεχωριστά, μεταξύ των κλινικών φαινοτύπων των φορέων της μετάλλαξης του γονιδίου *F12*. Οι Zuberbier et al [191] υποστήριξαν ότι ο αυξημένος σχηματισμός κινίνης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν ένδειξη εμφάνισης της νόσου.

Αυτό το είδος HAE χαρακτηρίστηκε αρχικά από κανονικά επίπεδα C1-INH και C4, ακόμη και κατά τη διάρκεια των επεισοδίων [126, 127, 192, 193, 194]. Ωστόσο, οι Bouillet et al [195] και

άλλοι [153, 154] ανακάλυψαν ότι η δραστηριότητα του C1-INH ήταν φυσιολογική ή σχεδόν φυσιολογική σε περιόδους χωρίς συμπτωματολογία, αλλά χαμηλότερη κατά τη διάρκεια της θεραπείας στο 67% των γυναικών-ασθενών που εξετάστηκαν. Οι Picone et al [164] περιέγραψαν δύο γυναίκες-ασθενείς κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους, οι οποίες παρουσίαζαν παροδική ανεπάρκεια του C1-INH. Οι Marcos et al [145] παρατήρησαν μείωση του C1-INH (κάτω από το 50%) κατά τη διάρκεια των επεισοδίων και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε υψηλές συγκεντρώσεις οιστρογόνων. Δύο ασθενείς είχαν φυσιολογική λειτουργία του C1-INH κατά τη διάρκεια της αντιπηκτικής θεραπείας, αλλά μειώθηκε κατά τη διάρκεια των επεισοδίων.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

---

## 4. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

### 4.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΝΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *SERPING1*

Στη μελέτη για την ανίχνευση ιντρονικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1* συμπεριλήφθηκαν δεκαπέντε δείγματα DNA (4 ελληνικά, 2 ουγγρικά, 4 πολωνικά, 3 βουλγαρικά, 2 γερμανικά; 7 άνδρες, 8 γυναίκες; μέση ηλικία  $43 \pm 16,2$  ετών) που διαγνώστηκαν με C1-INH-HAE τύπου I, σύμφωνα με τα κριτήρια που έχει ορίσει η επιτροπή που ενασχολείται με το κληρονομικό αγγειοίδημα [11], αλλά χωρίς μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1* μετά από συμβατική μοριακή ανάλυση. Οικογενειακή μελέτη έγινε εφικτή σε έξι οικογένειες. Επτά υγιείς και είκοσι δύο ασθενείς με C1-INH-HAE συγγενείς των ασθενών εξετάστηκαν (μέσος όρος ηλικίας  $64,4 \pm 18,6$ ; 13 γυναίκες, 16 άνδρες).

Επιπρόσθετα, σαν δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 197 ασθενείς με nC1-INH-HAE και 46 δείγματα από υγιή άτομα.

Η μελέτη έλαβε την έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας και Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τηρεί τους κανόνες της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Επιπρόσθετα, ελήφθησαν έγγραφες υπογεγραμμένες συγκαταθέσεις από τα άτομα που συμμετείχαν, τόσο για τη διενέργεια του μοριακού ελέγχου των ίδιων ή και των ανήλικων μελών της οικογένειάς τους, όσο και για τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων σε επιστημονικά περιοδικά.

### 4.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *F12*

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 197 ασθενείς με nC1-INH-HAE, οι οποίοι ανήκουν σε 166 οικογένειες ευρωπαϊκής καταγωγής, 161 ασθενείς με C1-INH-HAE (154 τύπου I, 7 τύπου II) και 46 δείγματα από υγιή μέλη των οικογενειών τους. Τα δείγματα DNA των ασθενών με nC1-INH-HAE προήλθαν από 141 U-HAE, 8 FXII-HAE, 20 INH-AAE, 3 ACEI-AAE, 5 CPN1, 20 δείγματα από ασθενείς με επαναλαμβανόμενα επεισόδια αγγειοιδήματος και φυσιολογικό C1-INH αλλά με άγνωστο οικογενειακό ιστορικό που δεν πληρεί τα κριτήρια για INH-AAE (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1:** Τόπος καταγωγής των οικογενειών που έλαβαν χώρα στη μελέτη για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *F12*.

Τόπος Καταγωγής	nC1-INH-HAE	C1-INH-HAE
Ελληνική	34	32
Ρουμάνικη	0	18
Ουγγρική	53	31
Γερμανική	5	25
Ισπανική	29	11
Πολωνική	9	28
Ιταλική	31	0
Γαλλική	3	0
Βουλγαρική	2	16
Σύνολο	166	161

Επιπρόσθετα, σε 320 δείγματα (161 nC1-INH-HAE, 159 C1-INH-HAE) τα οποία ανήκουν σε

διαφορετικές οικογένειες έλαβε χώρα ανάλυση για την ανίχνευση μεγάλων ελλείψεων ή διπλασιασμών στο γονίδιο *F12* (CNV analysis).

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο **4.1**, λήφθηκε συγκατάθεση από όλους τους ασθενείς και τα μέλη της οικογένειας τους που έλαβαν μέρος στη μελέτη.

Τα μηχανήματα, ο μετρητικός εξοπλισμός, τα διάφορα αναλώσιμα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο παράρτημα (**Πίνακας 17, Πίνακας 18, Πίνακας 19, Πίνακας 20**).

## 5. ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ ΈΡΕΥΝΑΣ

### 5.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΝΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ *SERPING1*

#### 5.1.1. ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΜΕ NGS

Η ανίχνευση νέων ιντρονικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1* και οι επτά οικογενειακές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με την τεχνολογία αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS). Σχεδιάστηκε ένα panel χρωμοσωμικών περιοχών χρησιμοποιώντας το Ion AmpliSeq Designer (Thermo Fisher Scientific), με σκοπό την κάλυψη ολόκληρου του γονιδίου *SERPING1* (NM\_000062.2) συμπεριλαμβανομένων των 5' και 3' αμετάφραστων περιοχών, των εξωνικών και ιντρονικών περιοχών (Chr11:57.364.831-57.382.476; GRCh37). Η κάλυψη που επιτεύχθηκε ήταν 99,9% και 79,9% στις εξωνικές και ιντρονικές περιοχές του γονιδίου *SERPING1*, αντίστοιχα. Οι ιντρονικές περιοχές για τις οποίες δεν επιτεύχθηκε πλήρης κάλυψη εντοπίζονται στα ιντρόνια 3, 4 και 6 (41,4%, 42,2% και 22,5%, αντίστοιχα) (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Παρουσίαση των περιοχών του γονιδίου *SERPING1*, των χρωμοσωμικών συντεταγμένων των ιντρονίων και των εξωνίων του γονιδίου, του μεγέθους της κάθε περιοχής και του αριθμού των βάσεων που δεν καλύπτει το panel των γονιδίων.

Περιοχή	Χρωμοσωμικές συντεταγμένες	Μέγεθος (bp)	Απώλεια bp	Κάλυψη (%)
Εξώνιο 1	ch11:57.365.027-57.365.195	168	0	100
Ιντρόνιο1	ch11:57.365.196-57.365.721	526	8	98,48
Εξώνιο 2	ch11:57.365.722-57.365.794	73	1	98,63
Ιντρόνιο 2	ch11:57.365.795-57.367.351	1557	20	98,72
Εξώνιο 3	ch11:57.367.352-57.367.850	499	0	100
Ιντρόνιο 3	ch11:57.367.851-57.369.507	1657	686	58,60
Εξώνιο 4	ch11:57.369.508-57.369.642	135	0	100
Ιντρόνιο 4	ch11:57.369.643-57.373.482	3840	1620	57,81
Εξώνιο 5	ch11:57.373.483-57.373.686	204	0	100
Ιντρόνιο 5	ch11:57.373.687-57.373.880	194	0	100
Εξώνιο 6	ch11:57.373.881-57.374.020	140	0	100
Ιντρόνιο 6	ch11:57.374.021-57.379.189	5169	1161	77,54
Εξώνιο 7	ch11:57.379.190-57.379.409	220	0	100
Ιντρόνιο 7	ch11:57.379.410-57.381.800	2391	357	85,07
Εξώνιο 8	ch11:57.381.801-57.382.326	526	0	100

Η απομόνωση του γενετικού υλικού από ολικό αίμα έγινε με τη χρήση του iPrep Pure Link DNA blood kit (Invitrogen) και η διαδικασία έλαβε χώρα στο μηχάνημα iPrep™ Purification Instrument (Thermo Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η συγκέντρωση του γενετικού υλικού με τη χρήση του Qubit® dsDNA HS Assay Kits (Life Technologies) στο μηχάνημα Fluorometer Qubit® 2.0 ή Qubit Fluorometer 4.0 (Life Technologies) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για την προετοιμασία της βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε το Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies) και το Ion Xpress™ Barcode Adapter 1-96 Kit (Thermo Scientific). Η διαδικασία εκτελέστηκε στο μηχάνημα Thermal Cycler Veriti (Life Technologies). Η ποσοτικοποίηση των βιβλιοθηκών έγινε με το Qubit® dsDNA HS Assay Kits (Life Technologies) στο μηχάνημα Fluorometer Qubit® (Life Technologies). Οι βιβλιοθήκες αραιώθηκαν στα 100 pM και έγινε συνδυασμός τους προσθέτοντας ίσες ποσότητες από τις διαφορετικές βιβλιοθήκες. Η βιβλιοθήκη ενισχύθηκε

κλωνικά με τη χρήση του PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Life Technologies) στο μηχάνημα Ion OneTouch™ 2 Instrument (Life Technologies). Η PCR σε γαλάκτωμα (emulsion PCR) λαμβάνει χώρα για την ενίσχυση των κλώνων DNA σε ISPs σφαιρίδια. Τα ISPs εμπλουτίστηκαν με τη χρήση του Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (Thermo Scientific) και πλύθηκαν με το IonOneTouch Wash Solution το οποίο περιλαμβάνεται στο Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Life Technologies) χρησιμοποιώντας το Ion One Touch ES (Life Technologies). Η αλληλούχηση έγινε σε πλατφόρμα NGS με τη χρήση του Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit (Life Technologies) στο μηχάνημα Ion PGM™ System (Life Technologies). Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το λογισμικό Torrent Server v.5.2 (Thermo Scientific) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δεδομένων NGS. Τα plug in που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Coverage Analysis v.5.2.1.2 και το Variant Caller v.5.2. χρησιμοποιώντας ως γονιδίωμα αναφοράς το hg19 (*SERPING1*, NM\_000062.2). Η μετέπειτα ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε στο λογισμικό Ion Reporter software v.5.2 (Thermo Scientific). Η οπτικοποίηση των μεταλλάξεων έλαβε χώρα με το πρόγραμμα integrative genome viewer v2.2 (IGV, Broad Institute).

Οι μεταλλάξεις εξετάστηκαν ως προς τη συχνότητα τους στον παγκόσμιο και ευρωπαϊκό πληθυσμό σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Genome Aggregation Database (gnomAD). Επίσης, εξετάστηκε η ύπαρξη τους στη βάση δεδομένων Single Nucleotide Polymorphisms [196] build 141 GRCh37.p13 (dbSNP).

Η πιθανή επίδραση των φιλτραρισμένων ιντρονικών μεταλλάξεων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας δέκα διαφορετικά βιοπληροφορικά εργαλεία. Η αλληλουχία με και χωρίς την εκάστοτε μετάλλαξη υποβλήθηκε σε πέντε από τα βιοπληροφορικά εργαλεία τα οποία εξετάζουν την επίδραση της μετάλλαξης κατά τη διάρκεια της μεταγραφής: το NNSPLICE [197], το Netgene2 [198], το Alternative Splice Site Predictor (ASSP) [199], το FSPLICE και το Human Splicing Finder (HSF) [200, 201]. Αυτά τα βιοπληροφορικά εργαλεία παρέχουν μία βαθμολογία, η οποία συμβολίζει τη πιθανότητα η θέση της μετάλλαξης να λειτουργήσει ως θέση ματίσματος.

Η παθογονικότητα των φιλτραρισμένων ιντρονικών μεταλλάξεων εξετάστηκε με πέντε επιπλέον βιοπληροφορικά εργαλεία. Το Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) παρέχει μία πρόβλεψη για τη λειτουργική επίδραση των μεταλλάξεων [202]. Το Transcript-inferred Pathogenicity score (Trap score) αξιολογεί την ικανότητα μίας μετάλλαξης να προκαλέσει μία παθολογική κατάσταση καταστρέφοντας το τελικό μετάγραφο [203]. Το DANN αποτελεί μία μεθοδολογία για τη βαθμολόγηση της παθογονικότητας, η οποία βασίζεται σε βαθιά νευρωνικά δίκτυα [204]. Το Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) αξιολογεί πόσο συντηρημένη είναι η περιοχή στην οποία εμφανίζεται η μετάλλαξη [205]. Τέλος, το βιοπληροφορικό εργαλείο SpliceAid 2 προβλέπει την τροποποίηση του μοτίβου ματίσματος που οφείλεται στη μετάλλαξη [206, 207].

Η βαθμολογία που παρέχεται από τα βιοπληροφορικά εργαλεία μπορεί να ερμηνευτεί όπως αναλύεται παρακάτω:

- **NNSPLICE:** Τα όρια κυμαίνονται από το 0 μέχρι το 1, με ελάχιστο αποτέλεσμα για την περιοχή ματίσματος 5' και 3' να είναι 0,4 [208]. Σε περίπτωση που η μετάλλαξη δεν προκαλεί τη δημιουργία θέσης ματίσματος δεν εμφανίζεται στον πίνακα που παρέχεται σαν αποτέλεσμα.
- **Netgene2:** Τα όρια κυμαίνονται από το 0,5 μέχρι το 0,95 [209]. Σε περίπτωση που η μετάλλαξη δεν προκαλεί τη δημιουργία θέσης ματίσματος δεν εμφανίζεται στον πίνακα που παρέχεται σαν αποτέλεσμα.
- **ASSP:** Τα όρια κυμαίνονται από το 0 μέχρι το 1 [210]. Σε περίπτωση που η μετάλλαξη δεν προκαλεί τη δημιουργία θέσης ματίσματος δεν εμφανίζεται στον πίνακα που παρέχεται σαν αποτέλεσμα.

- **FSPLICE:** Το όριο για τις 3' θέσεις ματίσματος είναι 4,175 και το όριο για τις 5' θέσεις ματίσματος είναι 6,099 [211]. Σε περίπτωση που η μετάλλαξη δεν προκαλεί τη δημιουργία θέσης ματίσματος δεν εμφανίζεται στον πίνακα που παρέχεται σαν αποτέλεσμα.
- **CADD:** Τα όρια κυμαίνονται από το 0 μέχρι το 30 [212]. Πιο συγκεκριμένα, αποτέλεσμα μεγαλύτερο από 30 σημαίνει ότι η μετάλλαξη είναι εξαιρετικά παθογονική. Αποτέλεσμα μεγαλύτερο από 20 ότι είναι παθογονική. Αποτέλεσμα το οποίο κυμαίνεται από 15 έως 20 σημαίνει ότι η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως πιθανώς παθογονική. Αποτέλεσμα μικρότερο από 15 σημαίνει ότι η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως πιθανώς καλοήθης και μικρότερο από 10 ως καλοήθης.
- **Trap:** Τα όρια κυμαίνονται από το 0 μέχρι το 1, με το 1 να χαρακτηρίζει την πιο παθογονική μετάλλαξη [213].
- **DANN:** Τα όρια κυμαίνονται από το 0 μέχρι το 1, με το 1 να χαρακτηρίζει την πιο παθογονική μετάλλαξη.
- **GERP:** Τα όρια κυμαίνονται από το -12,3 μέχρι το 6,17, με πιο συντηρημένη περιοχή να λαμβάνει τη βαθμολογία 6,17.

Οι φιλτραρισμένες μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν διασταυρώθηκαν ως προς τη παθογονικότητα τους με καταχωρήσεις της βάσης δεδομένων ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Τέλος, αναζητήθηκαν στη βάση δεδομένων Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) με σκοπό τη βιβλιογραφική διερεύνηση της σύνδεσης τους με το C1-INH-HAE .

### 5.1.2. ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΚΑΤΑ SANGER

Η επαλήθευση τριών πιθανώς παθογονικών ιντρονικών μεταλλάξεων (c.-22-155G>T, c.890-14C>G, c.1029+384A>G) στο γονίδιο *SERPING1* και οι οικογενειακές μελέτες για τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις πραγματοποιήθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger. Πιο συγκεκριμένα, από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100-250 ng γενωμικού DNA που ενισχύθηκαν σε αντίδραση PCR συνολικού όγκου 30 μl που περιείχε 200 μM από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 30 pmoles από τον κάθε έναν από τους δύο εκκινητές, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, ρυθμιστικό διάλυμα 10X και 1,26 U του ενζύμου Taq πολυμεράση (Thermo Fisher). Ο Πίνακας 3 παρουσιάζει τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για την αλληλούχηση των ιντρονικών περιοχών ένα, πέντε και έξι του γονιδίου *SERPING1*, καθώς και τις συνθήκες της αντίδρασης PCR. Οι αντιδράσεις διενεργήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR καθαρίστηκαν με τη χρήση του αντιδραστήριου USB ExoSAP-IT (Affymetrix Inc) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αλληλούχηση κατά Sanger έλαβε χώρα στον γενετικό αναλυτή 3730 DNA Analyzer (Life Technologies) με τη χρήση του αντιδραστήριου BigDye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάλυση των δεδομένων διενεργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Sequence Scanner v.2 (Applied Biosystems).



**Πίνακας 3:** Αλληλουχίες των εκκινητών και συνθήκες PCR για την αλληλούχηση των ιντρονικών περιοχών του γονιδίου *SERPING1*.

Περιοχή	Εκκινητές	Συνθήκες PCR αντίδρασης
Ιντρόνιο 1 [60]	F:5'CTGCACCCAAGCTTCCCCGTTACAC3' R:5'CCCCGTCCCCCATCCACAAG3'	94°C για 2 min, 30 κύκλοι: 94°C για 45 sec, 65°C για 45 sec, 72°C για 1 min, τελική επιμήκυνση: 72°C για 5 min
Ιντρόνιο 5 [60]	F:5'ACGACGTGTTTCAGACTCAT3' R:5'AAAAGATAGGGTGGAATACAGAT3'	94°C για 2 min, 30 κύκλοι: 94°C για 45 sec, 60°C για 45 sec, 72°C για 45 sec, τελική επιμήκυνση: 72°C για 5 min
Ιντρόνιο 6 [76]	F:5'GAAACCTACTTGAGTCTCCTGAC3' R:5'CTTTGTTTCTCAGCCAGGTATTG3'	94°C για 2 min, 30 κύκλοι: 94°C για 45 sec, 49°C για 45 sec, 72°C για 45 sec, τελική επιμήκυνση: 72°C για 5 min

### 5.1.3. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Για να διερευνηθεί η παθογονικότητα της ιντρονικής μετάλλαξης c.-22-155G>T στο ιντρόνιο ένα του γονιδίου *SERPING1* συλλέχθηκε ολικό αίμα από τον ασθενή και τρία μέλη της οικογένειας του που φέρουν τη μετάλλαξη και είναι ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό rs4926 (c.1438G>A). Μέσα σε 24 ώρες από την συλλογή του αίματος διενεργήθηκε η απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων με την προσθήκη του αίματος με αργή έγχυση πάνω στη στιβάδα της φικόλης (4 ml αίματος σε 4 ml φικόλης). Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 1200 rpm για 30 min με αργή επιτάχυνση και χωρίς φρένο. Η στοιβάδα των μονοπύρηνων κυττάρων συλλέχθηκε με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας Pasteur και τοποθετήθηκε σε καινούριο αποστειρωμένο σωληνάριο των 15 ml. Στο αποστειρωμένο σωληνάριο με τα μονοπύρηννα κύτταρα προστέθηκε 1 x PBS μέχρι τα 10 ml. Το σωληνάριο φυγοκεντρήθηκε στα 1600 rpm για 7 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε εναίωρηση των κυττάρων με 1 ml 1 x PBS σε 1,7 ml φιαλίδιο erpendorf ελεύθερο RNασών. Τέλος, το 1,7 ml erpendorf φυγοκετρήθηκε σε μικροφυγόκεντρο στα 3500 rpm για 6 min και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με προσοχή και αποθηκεύτηκε το ίζημα σε κατάψυξη -80°C μέχρι τη χρήση τους.

Καθώς απώτερος σκοπός της διαδικασίας αποτέλεσε η απομόνωση του RNA, για να αποφευχθεί η αποδιάταξη του, όλες οι επιφάνειες καθαρίστηκαν με ειδικό διάλυμα RNase Zap, το οποίο απενεργοποιεί τα ένζυμα που καταστρέφουν το RNA. Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν υλικά τα οποία είναι ελεύθερα RNασών από τον κατασκευαστή.

Η εκχύλιση του RNA έλαβε χώρα με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI. Αρχικά, αποψύχθηκε το ίζημα από την κατάψυξη -80°C και απευθείας προστέθηκε σε αυτό 1 ml TRI. Για την πλήρη ομογενοποίηση του μείγματος έγινε ισχυρή ανακίνηση του φιαλιδίου και εισαγωγή του μείγματος μέσα από σύριγγα 2,5 ml. Στη συνέχεια, το μείγμα επώαστηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος για 5 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4°C για 10 min στα 12000 g. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο 1,7 ml φιαλίδιο erpendorf ελεύθερο RNασών και προσθήκη 100 μl χλωροφορμίου. Το δείγμα ανακινήθηκε με σκοπό την ομοιογένεια του μείγματος και επώαστηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος για 8 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4°C για 10 min στα 12000 g. Η υδατινή στοιβάδα μεταφέρθηκε σε νέο 1,7 ml φιαλίδιο erpendorf ελεύθερο RNασών και προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλη. Στο φιαλίδιο έγινε ισχυρή ανακίνηση και επώαστηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος για 5 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 20°C για 8 min στα 12000 g. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml 75%

αιθανόλης με ισχυρή ανακίνηση του φιαλιδίου. Το φιαλίδιο φυγοκεντρήθηκε στους 4°C για 5 min στα 7600 g, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το φιαλίδιο παρέμεινε ανοικτό σε συνθήκες περιβάλλοντος για 30 min, ώστε να εξατμιστεί η εναπομείνουσα αιθανόλη. Τέλος, επαναδιαλύθηκε το pellet σε 33 μl νερό.

Για την ποσοτικοποίηση του RNA χρησιμοποιήθηκαν 2 μl τα οποία μετρήθηκαν με φωτομέτρηση. Επαλήθευση της συγκέντρωσης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% με βρωμιούχο αιθίδιο.

Για να λάβει χώρα η μετατροπή των μορίων RNA σε cDNA, απαιτείται η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Πιο συγκεκριμένα, για τη σύνθεση του πρώτου κλώνου cDNA χρησιμοποιήθηκε 1 mg RNA σε αντίδραση που περιείχε 25 mM εξαμερή ως τυχαίοι εκκινητές (Roche), 10 mM dNTPs (Invitrogen), αναστολέα RNAσών (Promega) και 200 U/μl M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), το οποίο περιέχει 5xRT buffer, M-MLV RT (200 U/μl) και 0,1 M DTT.

Τα δείγματα RNA και τα αντιδραστήρια αποψύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε πάγο μέχρι τη χρήση τους. Ο **Πίνακας 4** παρουσιάζει τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για την προετοιμασία του μείγματος.

**Πίνακας 4:** Αναλογία των αντιδραστηρίων για τη σύνθεση cDNA.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά δείγμα (μl)
5xRT buffer	5
dNTP mix (10 mM)	2
Αναστολέας RNAσών	0,6
RT	1,25
0,1M DTT	2,25
<b>Συνολικός όγκος</b>	<b>11,1</b>

Σε 0,2 ml RCR Tube (Corning) προστέθηκαν 4 μl εξαμερή ως τυχαίοι εκκινητές, 1 mg RNA και συμπληρώθηκε με νερό ώστε ο τελικός όγκος να αγγίζει τα 14 μl. Το 0,2 ml RCR Tube τοποθετήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies) στους 7°C για 2 min και στη συνέχεια προστέθηκε 11 μl του μείγματος αντιδραστηρίων που προετοιμάστηκε παραπάνω. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 42°C για 60 min και στους 65°C για 10 min. Στο τέλος της αντίδρασης προστέθηκαν 25 μl νερό και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Στο παραγόμενο cDNA, ένα θραύσμα από τα εξώνια 6 με 8 ενισχύθηκε, αλληλουχήθηκε και συγκρίθηκε με την αλληλουχία gDNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR είναι ο F:5'AACTCAGTTATAAAAGTGCCCATGATGAAT3' [214] και ο R:5'CCCTTTTGGTGGATAGCG3' [42]. Πιο συγκεκριμένα, από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100-250 ng cDNA που ενισχύθηκε σε αντίδραση PCR συνολικού όγκου 30 μl που περιείχε 200 μM από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 30 pmol από τον κάθε έναν από τους δύο εκκινητές, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, ρυθμιστικό διάλυμα 10X και 1,26 U του ενζύμου Taq πολυμεράση (Thermo fisher). Το μείγμα τοποθετήθηκε σε έναν θερμοκυκλοποιητή Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies) και οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι 94°C για 2 min, 35 κύκλοι: 94°C για 1 min, 55°C για 1 min, 72°C για 1 min, τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 min. Το ενισχυμένο προϊόν της αντίδρασης PCR καθαρίστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου USB ExoSAP-IT (Affymetrix Inc) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αλληλούχηση κατά Sanger έλαβε χώρα στον γενετικό αναλυτή 3730 DNA Analyzer (Life Technologies) και του αντιδραστηρίου BigDye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάλυση των δεδομένων διενεργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Sequence Scanner v.2 (Applied Biosystems).

Για να διερευνηθεί η παθογονικότητα της ιντρονικής μετάλλαξης c.890-14C>G συλλέχθηκε ολικό αίμα από τον ασθενή και τρία μέλη της οικογένειας του (δύο ασθενείς και δύο υγιείς). Τα μονοπύρηνια κύτταρα διαχωρίστηκαν με διαβάθμιση φικόλης και το συνολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση του TRI. Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η σύνθεση του cDNA, με την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω. Στο παραγόμενο cDNA, ένα θραύσμα από τα εξώνια 3 έως 6 ενισχύθηκε, αλληλουχήθηκε και συγκρίθηκε μεταξύ των υγείων και των ασθενών με σκοπό την ανεύρεση διαφορών στο παραγόμενο mRNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR ήταν ο F:5'CTCTACCACGCCTTCTCAGCAATGAA-GAAG3' και ο R:5'GGCTTTCAAAGTTTGGTCAATGAAATGGGC3' [56]. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν 94 °C για 2 min, 35 κύκλοι: 94 °C για 1 min, 55 °C για 1 min, 72 °C για 1 min, τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min. Το ενισχυμένο προϊόν της αντίδρασης PCR καθαρίστηκε με τη χρήση του αντιδραστήριου USB ExoSAP-IT (Affymetrix Inc) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αλληλούχηση κατά Sanger έλαβε χώρα στον γενετικό αναλυτή 3730 DNA Analyzer (Life Technologies) με τη χρήση αντιδραστήριου BigDye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάλυση των δεδομένων διενεργήθηκε με το πρόγραμμα Sequence Scanner v.2 (Applied Biosystems).

#### 5.1.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ

Για τον χαρακτηρισμό της παθογονικότητας των μεταλλάξεων ακολουθήθηκαν οι κατευθυντήριες οδηγίες του American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)/Association for Molecular Pathology (AMP) [215]. Με βάση τα ACMG κριτήρια οι χαρακτηρισμοί που αποδόθηκαν στις μεταλλάξεις είναι: καλοήθης (benign), πιθανώς καλοήθης (likely benign), πιθανώς παθογονική (likely pathogenic), παθογονική (pathogenic) και μετάλλαξη άγνωστης παθογονικότητας (variants of uncertain significance, VUS).

## 5.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *F12*

### 5.2.1. ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΜΕ NGS

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *F12* σχεδιάστηκε ένα panel χρωμοσωμικών περιοχών χρησιμοποιώντας το Ion AmpliSeq Designer (Thermo Fisher Scientific), προκειμένου να αναλυθούν όλες οι εξωνικές περιοχές, οι θέσεις σύνδεσης εξωνίων-ιντρονίων και οι αμετάφραστες (5' και 3'-UTR) περιοχές του γονιδίου *F12*. 16 amplicons διαιρούμενα σε δύο ομάδες εκκινητών παρέχουν πλήρη κάλυψη των μεταφραζόμενων περιοχών του γονιδίου. Πρόσθετα amplicons (809 συνολικά) για 55 διαφορετικά γονίδια [216], που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της βραδυκινίνης, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου *SERPING1*, εισήχθησαν στο panel.

Η απομόνωση του γενετικού υλικού, η μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA και η αλληλούχηση με NGS περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα 5.1.1. Πρέπει να σημειωθεί ότι 396 δείγματα DNA αλληλουχήθηκαν με τη χρήση του Ion PGM™ System και 11 δείγματα αλληλουχήθηκαν με τη χρήση του συστήματος S5. Πιο συγκεκριμένα, οι άνωθεν διαδικασίες που περιλαμβάνουν μέρος της προετοιμασίας των βιβλιοθηκών αυτοματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το Ion Chef™ (Life Technologies) και τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονται στο Ion 520™ & Ion 530™ ExT Kit-Chef (Thermo Fisher). Ο φόρτος εργασίας και ο αριθμός των χειροκίνητων βημάτων μειώθηκαν, ενώ η απόδοση φόρτωσης του τσιπ και η ομοιομορφία φόρτωσης αυξήθηκαν χρησιμοποιώντας το Ion Chef™ σε σύγκριση με την απόδοση που επιτεύχθηκε με το σύστημα Ion OneTouch™ 2.

Η αλληλούχηση των 11 δειγμάτων έγινε σε πλατφόρμα NGS με τη χρήση του Ion 520™ & Ion 530™ ExT Kit-Chef (Thermo Fisher) στο μηχάνημα Ion Torrent S5 (Life Technologies) και οι διαδικασίες έλαβαν χώρα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η αρχική ανάλυση των δεδομένων αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό Torrent Server v.5.2 (Thermo Scientific) με τη χρήση των plug in Coverage Analysis v.5.2.1.2 και Variant Caller v.5.2. χρησιμοποιώντας ως γονιδίωμα αναφοράς το hg19 (F12, NM\_000505.3). Στη συνέχεια, περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων (annotation) έγινε στο λογισμικό Ion Reporter software v.5.2 (Thermo Scientific).

Η πρόβλεψη της παθογονικότητας των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν βασίστηκε στα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) και PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/rpnh2/>). Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την αξιολόγηση του πόσο συντηρημένη είναι η περιοχή στην οποία εμφανίζεται η μετάλλαξη [205]. Για την εκτίμηση της παθογονικότητας των συνώνυμων μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκε το βιοπληροφορικό εργαλείο Human Splicing Finder [200, 201], καθώς τα εργαλεία SIFT και Polyphen2 δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεταλλάξεις που δεν τροποποιούν άμεσα το πρωτεϊνικό προϊόν. Η συχνότητά της εκάστοτε ανιχνευμένης μετάλλαξης συγκρίθηκε με την αντίστοιχη συχνότητα στον παγκόσμιο και ευρωπαϊκό πληθυσμό που παρουσιάζεται στη βάση πληθυσμιακών δεδομένων gnomAD. Η βαθμολογία που παρέχεται από τα βιοπληροφορικά εργαλεία μπορεί να ερμηνευτεί όπως αναλύεται παρακάτω:

- **SIFT:** Η βαθμολογία SIFT προβλέπει εάν μια υποκατάσταση αμινοξέος επηρεάζει τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Η βαθμολογία κυμαίνεται από 0,0 (επιβλαβής) έως 1,0 (ανεκτή). Από 0,0 έως 0,05 - Οι παραλλαγές με βαθμολογίες σε αυτό το εύρος θεωρούνται επιβλαβείς. Οι παραλλαγές με βαθμολογία κοντά στο 0,0 προβλέπονται με μεγαλύτερη πιθανότητα ότι είναι επιβλαβείς. Από 0,05 έως 1,0 - Οι παραλλαγές με βαθμολογίες σε αυτό το εύρος προβλέπεται να είναι ανεκτές (καλοήθειες).
- **PolyPhen2:** Η βαθμολογία PolyPhen-2 προβλέπει το πιθανό αντίκτυπο μιας υποκατάστασης αμινοξέων στη δομή και τη λειτουργία μιας ανθρώπινης πρωτεΐνης. Αυτή η βαθμολογία αντιπροσωπεύει την πιθανότητα ότι μια υποκατάσταση είναι καταστροφική. Η βαθμολογία PolyPhen-2 κυμαίνεται από 0,0 (καλοήθης) έως 1,0 (παθογονική). Οι παραλλαγές με βαθμολογία 0,0 προβλέπεται να είναι καλοήθειες. Οι τιμές που πλησιάζουν το 1,0 προβλέπονται με μεγαλύτερη πιθανότητα ότι είναι παθογονικές. Η βαθμολογία μπορεί να ερμηνευθεί ως εξής: Από 0,0 έως 0,15 - Οι παραλλαγές με βαθμολογίες σε αυτό το εύρος προβλέπεται να είναι καλοήθειες. Από 0,15 έως 1,0 - Οι παραλλαγές με βαθμολογίες σε αυτό το εύρος είναι πιθανώς παθογονικές. Από 0,85 έως 1,0 - Οι παραλλαγές με βαθμολογίες σε αυτό το εύρος προβλέπονται με μεγαλύτερη πιθανότητα ότι είναι παθογονικές.
- **GERP:** Τα όρια κυμαίνονται από το -12,3 μέχρι το 6,17, με πιο συντηρημένη περιοχή να λαμβάνει τη βαθμολογία 6,17.

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα integrative genomics viewer v2.2 (IGV, Broad Institute).

Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν διασταυρώθηκαν ως προς τη παθογονικότητα τους με καταγραφές της βάσης δεδομένων ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Τέλος, αναζητήθηκε η καταχώρησή τους στη βάση δεδομένων Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) με σκοπό τη βιβλιογραφική διερεύνηση της σύνδεσης του FXII-HAE με τις ανευρεθείσες μεταλλάξεις.

Η ανίχνευση των CNVs (copy number variations) βασίστηκε στον αλγόριθμο Hidden Markov Model στο λογισμικό Ion Reporter software v.5.2 (Thermo Scientific), χρησιμοποιώντας paired

CNV analysis, το φίλτρο «Confident Germline CNVs-CNVs Only» και τις προεπιλεγμένες παραμέτρους. Με τη χρήση της ανάλυσης αυτής, συγκρίθηκαν 320 δείγματα με ένα πρότυπο δείγμα ελέγχου το οποίο δεν παρουσιάζει CNVs στην περιοχή του γονιδίου *F12* (paired CNV analysis) με σκοπό την ανίχνευση διπλασιασμών ή ελλείψεων σε μεγάλη περιοχή του γονιδίου [216].

### 5.2.2. ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΚΑΤΑ SANGER

Η επαλήθευση των νέων πιθανώς παθογόνων μεταλλάξεων στο γονίδιο *F12* και οι έξι οικογενειακές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με αλληλούχηση κατά Sanger. Η διαδικασία της PCR, του καθαρισμού των προϊόντων της PCR και η αλληλούχηση κατά Sanger περιγράφονται στην παράγραφο 5.1.2. Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει τα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για την αλληλούχηση των εξωνίων ένα, έξι, επτά, εννέα και δώδεκα του γονιδίου *F12*, καθώς και τις συνθήκες της αντίδρασης PCR.

**Πίνακας 5:** Αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες PCR για την αλληλούχηση των εξωνίων του γονιδίου *F12* [217].

Περιοχή	Εκκινητές	Συνθήκες PCR αντίδρασης
Εξώνιο 1	F:5'CAAGGAAGTTGCTCCACTTGGC3' R:5'CATGGCTCATGGCTGTGATA3'	95°C για 5 min, 37 κύκλοι: 95°C για 1 min, 56°C για 1 min, 72°C για 1 min, τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 min
Εξώνιο 6	F:5'TTGCTGGATACTCGGAGACTTGGC3' R:5'GCACACCACCCGGCCTCTG3'	95°C για 5 min, 37 κύκλοι: 95°C για 1 min, 56°C για 1 min, 72°C για 1 min, τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 min
Εξώνιο 7	F:5'GATGGTTGGGAACGGGCCAGGGA3' R:5'TCTCATCTGCTTCCGCACTCTC3'	95°C για 5 min, 37 κύκλοι: 95°C για 1 min, 60°C για 1 min, 72°C για 1 min, τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 min
Εξώνιο 9	F:5'TGGGTGACCCCTCCGCCCA3' R:5'CCGGCTGGCCGGAATCTAGCT3'	95°C για 5 min, 37 κύκλοι: 95°C για 1 min, 58°C για 1 min, 72°C για 1 min, τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 min
Εξώνιο 12	F:5'CCCGTCAGTACCAGCACGA3' R:5'TACCAAAGTCGCGGGCTTCT3'	95°C για 5 min, 37 κύκλοι: 95°C για 1 min, 52°C για 1 min, 72°C για 1 min, τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 min

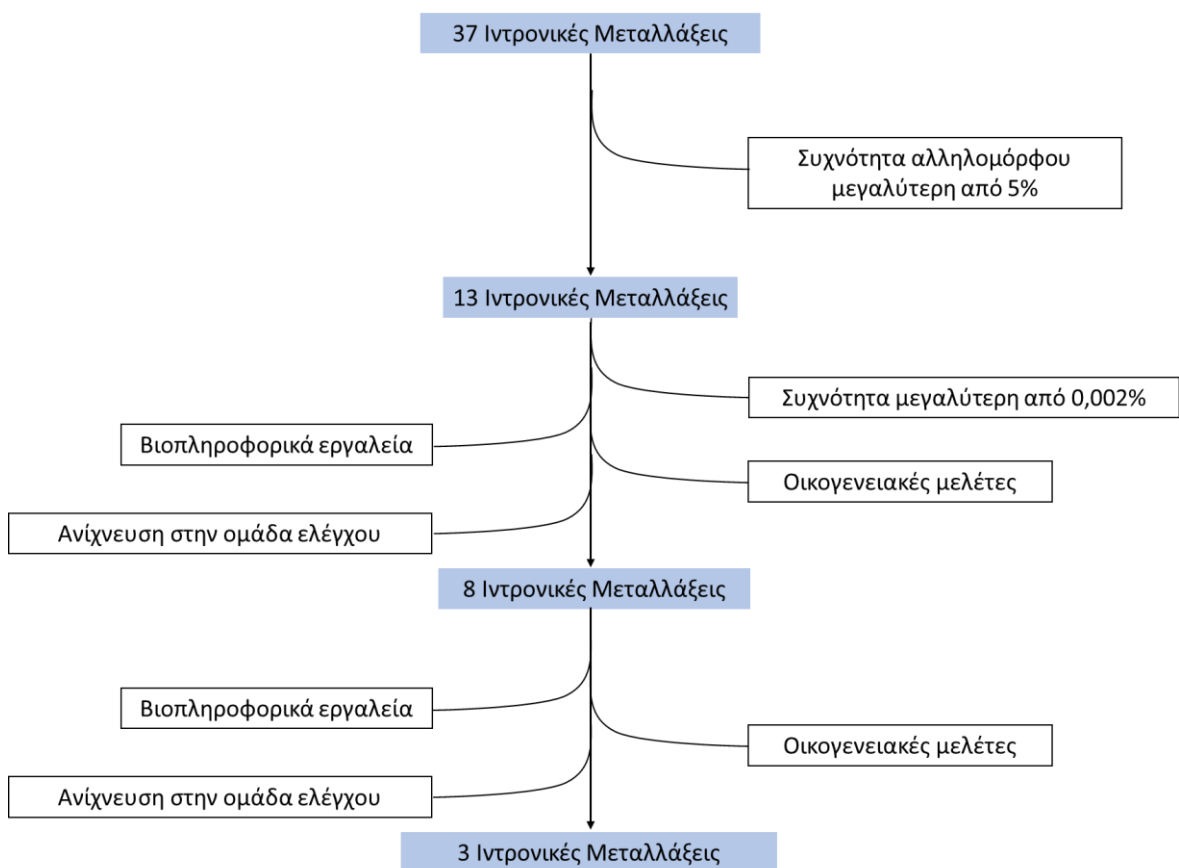
Για τον χαρακτηρισμό της παθογονικότητας των μεταλλάξεων ακολουθήθηκαν οι κατευθυντήριες οδηγίες του American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)/Association for Molecular Pathology (AMP) [215].

## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΝΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *SERPING1*

Στα δεκαπέντε δείγματα DNA από ασθενείς με C1-INH-HAE, τα οποία εξετάστηκαν με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων στις ιντρονικές περιοχές του γονιδίου *SERPING1*, επιβεβαιώθηκε η απουσία εξωνικών μεταλλάξεων στο γονίδιο με εξαίρεση δύο γνωστούς πολυμορφισμούς, τον rs4926 στο εξώνιο 8 και τον rs28362944 στο εξώνιο 2.

Ωστόσο, 37 διαφορετικές ιντρονικές μεταλλάξεις ανιχνεύτηκαν σε αυτούς τους ασθενείς. Οι 24 από αυτές έχουν συχνότητα αλληλομόρφου μεγαλύτερη από 5% (Πίνακας 6). Η εκτίμηση των 24 αυτών μεταλλάξεων με τα εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία παρουσιάζεται στο παράρτημα (Πίνακας 21). Η ροή εργασιών που ακολουθήθηκε για τον χαρακτηρισμό των 37 ιντρονικών μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν στο γονίδιο *SERPING1* φαίνεται στην **Εικόνα 9**.



**Εικόνα 9:** Ροή εργασιών που ακολουθήθηκε για το χαρακτηρισμό των 37 ιντρονικών μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν στο γονίδιο *SERPING1*.

**Πίνακας 6:** Η χρωμοσωμική θέση, η καταχώρηση στην βάση δεδομένων dbSNP, η ιντρονική θέση στο γονίδιο *SERPING1* και η συχνότητα στον παγκόσμιο και ευρωπαϊκό πληθυσμό των 24 ιντρονικών μεταλλάξεων με συχνότητα μεγαλύτερη από 5%.

Χρωμοσωμική θέση	Μετάλλαξη	dbSNP	Ιντρόνιο	gnomAD (%)	gnomAD (EU-%)
chr11:57.365.895	c.51+101G>A	rs28362945	2	12,66	16,08
chr11:57.366.405	c.51+625_51+626dupTG	rs3054018	2	38,70	32,10
chr11:57.366.656	c.52-696C>T	rs1005511	2	39,27	31,48
chr11:57.367.222	c.52-130C>T	rs1005510	2	38,50	31,54
chr11:57.369.008	c.551-500C>G	rs28362947	3	22,06	28,42
chr11:57.369.013	c.551-495A>C	rs28362948	3	22,05	28,41
chr11:57.369.353	c.551-155A>G	rs2936694	3	36,48	28,91
chr11:57.369.730	c.685+88G>A	rs11229063	4	22,25	28,70
chr11:57.370.742	c.685+1100C>T	rs78364821	4	22,52	28,67
chr11:57.371.911	c.686-1572G>T	rs28362949	4	22,10	28,45
chr11:57371918	c.686-1565G>A	rs28362950	4	22,43	28,44
chr11:57372526	c.686-957A>G	rs28362951	4	22,2	28,61
chr11:57374332	c.1029+312T>C	rs11603020	6	22,8	29,11
chr11:57374871	c.1029+851C>G	rs11229066	6	22,79	29,12
chr11:57374946	c.1029+926G>T	rs11229067	6	22,79	29,10
chr11:57375463	c.1029+1443G>C	rs78624400	6	22,82	29,15
chr11:57376130	c.1029+2110T>C	rs2454659	6	61,2	69,26
chr11:57376131	c.1029+2111G>A	rs138770460	6	22,7	28,94
chr11:57377968	c.1030-1222A>G	rs3824988	6	22,78	29,06
chr11:57377992	c.1030-1198G>T	rs2508443	6	32,92	39,81
chr11:57378325	c.1030-865C>T	rs2511989	6	38,38	40,16
chr11:57379170	c.1030-20A>G	rs2511988	6	58,43	68,09
chr11:57381263	c.1250-538T>C	rs10896631	7	22,77	29,07
chr11:57381519	c.1250-282T>C	rs1557522	7	30,9	40,02

Πέντε μεταλλάξεις (c.686-179A>G, c.1029+260G>A, c.1029+1497A>G, c.1030-1975G>C, c.1030-1513delT) έχουν συχνότητα αλληλομόρφου μεγαλύτερη από 0,002%, δηλαδή συχνότητα αλληλομόρφου μεγαλύτερη από τη συχνότητα του C1-INH-HAE. Ο Πίνακας 7 παρουσιάζει τη συχνότητα στον παγκόσμιο και ευρωπαϊκό πληθυσμό, τη χρωμοσωμική θέση και τη καταχώρηση τους στην βάση του NCBI. Ο Πίνακας 8 και ο Πίνακας 9 παρουσιάζουν τη βιοπληροφορική ανάλυση των μεταλλάξεων. Όπως είναι εμφανές από τους παρακάτω πίνακες, οι πέντε μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν την μεταγραφή και χαρακτηρίζονται ως καλοήθειες από τα βιοπληροφορικά εργαλεία.

#### c.686-179A>G

Η μετάλλαξη c.686-179A>G η οποία εντοπίστηκε στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.373.304), ανιχνεύτηκε σε έναν 58-χρονο ασθενή με κληρονομικό αγγειοοίδημα τύπου I

ουγγρικής καταγωγής. Εξετάστηκαν οχτώ ασθενή μέλη της οικογένειας του (6 άνδρες, 2 γυναίκες; μέσος όρος ηλικίας 28,4±14,2) και η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε όλα τα μέλη που εξετάστηκαν.

#### **c.1029+260G>A**

Η μετάλλαξη c.1029+260G>A, η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.374.280), ανιχνεύτηκε σε έναν 45-χρονο ασθενή με κληρονομικό αγγειοοίδημα τύπου Ι ελληνικής καταγωγής. Εξετάστηκαν τρία ασθενή μέλη της οικογένειας του (2 άνδρες, 1 γυναίκα; μέσος όρος ηλικίας 30,6±19,7) και η μετάλλαξη δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από αυτά. Αντιθέτως, ανιχνεύτηκε σε ένα υγιές άτομο από την ομάδα ελέγχου.

#### **c.1029+1497A>G**

Η μετάλλαξη c.1029+1497A>G, η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.375.517), ανιχνεύτηκε σε μία 53-χρονη ασθενή με C1-INH-HAE ουγγρικής καταγωγής, ωστόσο δεν ανιχνεύτηκε στα υπόλοιπα τρία ασθενή μέλη της οικογένειας της (1 άνδρας, 2 γυναίκες; μέσος όρος ηλικίας 32,3±14,2). Επιπλέον, η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς με U-HAE από την ομάδα ελέγχου.

#### **c.1030-1975G>C**

Η μετάλλαξη c.1030-1975G>C, η οποία εντοπίστηκε στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.377.215), ανιχνεύτηκε σε δύο μη συγγενείς ασθενείς C1-INH-HAE πολωνικής καταγωγής, ηλικίας 22 και 30 ετών. Εξετάστηκαν τέσσερα μέλη μίας οικογένειας (2 άνδρες, 2 γυναίκες; μέσος όρος ηλικίας 47,3±16), τα οποία είχαν διαγνωστεί με C1-INH-HAE και η μετάλλαξη δεν εντοπίστηκε στα τρία από τα τέσσερα άτομα. Επίσης, ανιχνεύτηκε σε τέσσερις ασθενείς με U-HAE από την ομάδα ελέγχου.

#### **c.1030-1513delT**

Η μετάλλαξη c.1030-1513delT στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.377.676), ανιχνεύτηκε σε μία 34-χρονη ασθενή με C1-INH-HAE γερμανικής καταγωγής. Εξετάστηκε ένα μέλος της οικογένειας της το οποίο έχει διαγνωστεί με κληρονομικό αγγειοοίδημα, ωστόσο δεν ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη.

**Πίνακας 7:** Η χρωμοσωμική θέση, η καταχώρηση στην βάση δεδομένων dbSNP, η ιντρονική θέση στο γονίδιο *SERPING1* και η συχνότητα στον παγκόσμιο και ευρωπαϊκό πληθυσμό των πέντε ιντρονικών μεταλλάξεων με συχνότητα μεγαλύτερη από 0,002%.

Χρωμοσωμική θέση	Μετάλλαξη	dbSNP	Ιντρόνιο	gnomAD (%)	gnomAD (EU-%)
chr11:57373304	c.686-179A>G	rs189335964	4	0,1	0,18
chr11:57374280	c.1029+260G>A	rs191053716	6	0,12	0,24
chr11:57375517	c.1029+1497A>G	rs17661117	6	0,70%	0,65
chr11:57377215	c.1030-1975G>C	rs151035150	6	1,13	1,63
chr11:57377676	c.1030-1513delT	rs1184255008	6	0,003	0,006



**Πίνακας 8:** Η εκτίμηση των πέντε ιντρονικών μεταλλάξεων με συχνότητα μεγαλύτερη από 0,002% με βάση τέσσερα βιοπληροφορικά εργαλεία. [NI, No impact; D, new donor; ISS, Intronic splicing silencer; ISE, Intronic splicing enhancer].

Μετάλλαξη	NNSPLICE	Netgene2	ASSP	HSF
c.686-179A>G	NI	NI	NI	NI
c.1029+260G>A	NI	NI	NI	Alteration of ESS
c.1029+1497A>G	NI	NI	NI	Activation of an intronic cryptic donor site
c.1030-1975G>C	NI	NI	NI	Alteration of ESS
c.1030-1513delT	NI	NI	NI	Activation of an intronic cryptic donor site/Alteration of ESS

**Πίνακας 9:** Η εκτίμηση των πέντε ιντρονικών μεταλλάξεων με συχνότητα μεγαλύτερη από 0,002% με βάση πέντε βιοπληροφορικά εργαλεία. [NI, No impact; D, new donor].

Μετάλλαξη	FSPLICE	CADD	Trap	DANN	GERP
c.686-179A>G	NI	4,62	0,05	0,62	0,731
c.1029+260G>A	NI	0,29	0,05	0,38	-5,5399
c.1029+1497A>G	NI	5,38	0,04	0,82	-2,0999
c.1030-1975G>C	NI	0,16	0,04	0,48	-2,8099
c.1030-1513delT	NI	NP	NP	NP	-5,6799

Οι εναπομείνουσες οκτώ μεταλλάξεις έχουν συχνότητα μικρότερη από 0,001%, δηλαδή συχνότητα αλληλομόρφου μικρότερη από τη συχνότητα του C1-INH-HAE. Έξι από αυτές τις μεταλλάξεις δεν έχουν αναφερθεί σε παγκόσμιες βάσεις δεδομένων (novel) και 2 έχουν αναφερθεί και στο παρελθόν. Ο Πίνακας 10 παρουσιάζει αυτές τις μεταλλάξεις, ο Πίνακας 11 και ο Πίνακας 12 παρουσιάζουν τη βιοπληροφορική ανάλυση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων με τα εννέα εργαλεία.

**Πίνακας 10:** Η χρωμοσωμική θέση, η καταχώρηση στην βάση δεδομένων dbSNP, η ιντρονική θέση στο γονίδιο *SERPING1* των οκτώ ιντρονικών μεταλλάξεων με συχνότητα μικρότερη από 0,001%.

Χρωμοσωμική θέση	Μετάλλαξη	dbSNP	Ιντρόνιο
chr11:57365567	c.-22-155G>T	-	1
chr11:57369352	c.551-156A>G	-	3
chr11:57371995	c.686-1488_686-1487insT	-	4
chr11:57372148	c.686-1335T>A	rs1156278971	4
chr11:57372150	c.686-1333A>T	-	4
chr11:57373867	c.890-14C>G	-	5
chr11:57374404	c.1029+384A>G	-	6
chr11:57381647	c.1250-154C>G	rs879810971	7

**Πίνακας 11:** Η εκτίμηση των οκτώ ιντρονικών μεταλλάξεων με βάση τέσσερα βιοπληροφορικά εργαλεία. [NI, No impact; D, new donor; ISS, Intronic splicing silencer; ISE, Intronic splicing enhancer].

Μετάλλαξη	NNSPLICE	Netgene2	ASSP	HSF
c.-22-155G>T	D:0,96	D:0,79	D:0,46	Activation of an intronic cryptic donor site
c.551-156A>G	NI	NI	NI	Creation of ESE
c.686-1488_686-1487insT	NI	NI	NI	Creation of an intronic ESE
c.686-1335T>A	NI	NI	NI	Alteration of ESS/ Creation of ESE
c.686-1333A>T	NI	NI	NI	NI
c.890-14C>G	NI	A:0,18	NI	Activation of an intronic cryptic acceptor site
c.1029+384A>G	D: 0,90	D:0,34	D:0,89	Activation of an intronic cryptic donor site
c.1250-154C>G	NI	NI	NI	Creation of ESE

**Πίνακας 12:** Η εκτίμηση των οκτώ ιντρονικών μεταλλάξεων με βάση πέντε βιοπληροφορικά εργαλεία. [NI, No impact; D, new donor].

Μετάλλαξη	FSPLICE	CADD	Trap	DANN	GERP
c.-22-155G>T	D:10,16	21,2	0,686	0,9507	4,8
c.551-156A>G	NI	1,427	0,103	0,3543	NP
c.686-1488_686-1487insT	NI	NP	NP	NP	1,252
c.686-1335T>A	NI	0,131	0,078	0,1134	-2,39
c.686-1333A>T	NI	0,969	0,012	0,1669	-2.75
c.890-14C>G	NI	4,918	0,464	0,6503	2,3399
c.1029+384A>G	D:0,34	7,069	0,229	0,4525	-0,749
c.1250-154C>G	NI	3,911	0,122	0,5833	1,0099

Όπως είναι εμφανές από τους παραπάνω πίνακες μόνο τρεις από τις οκτώ μεταλλάξεις με συχνότητα αλληλομόρφου μικρότερη από το 0,001% χαρακτηρίζονται ως παθογονικές από την πλειονότητα των βιοπληροφορικών εργαλείων (c.-22-155G>T, c.890-14C>G και c.1029+384A>G).

#### **c.551-156A>G**

Η μετάλλαξη c.551-156A>G, η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.369.352), ανιχνεύτηκε σε μία 53-χρονη ασθενή με C1-INH-HAE συγγενικής καταγωγής, αλλά δεν ανιχνεύτηκε στα υπόλοιπα τρία ασθενή μέλη της οικογένειας της (1 άνδρας, 2 γυναίκες; μέσος όρος ηλικίας 32,3±14,2). Επιπρόσθετα, ανιχνεύτηκε σε είκοσι τρία άτομα με nC1-INH-HAE από την ομάδα ελέγχου (15 U-HAE, 3 INH-AAE, 1 ACEI-AAE, 1 CPN1, 2 δείγματα από ασθενείς με επαναλαμβανόμενα επεισόδια αγγειοιδήματος και φυσιολογικό C1-INH αλλά με άγνωστο οικογενειακό ιστορικό που δεν πληρεί τα κριτήρια για INH-AAE, 1 υγιής).

#### **c.686-1488\_686-1487insT**

Η μετάλλαξη c.686-1488\_686-1487insT στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.371.995), ανιχνεύτηκε σε μία 63-χρονη ασθενή με C1-INH-HAE πολωνικής καταγωγής. Εξετάστηκαν τέσσερα ασθενή μέλη της οικογένειας της (3 άνδρες, 1 γυναίκα; μέσος όρος ηλικίας 39±13,4) και η μετάλλαξη δεν ανιχνεύτηκε σε κανέναν από τα συγγενή μέλη. Επιπλέον, ανιχνεύτηκε σε έναν U-HAE ασθενή από την ομάδα ελέγχου.

#### **c.686-1335T>A**

Η μετάλλαξη c.686-1335T>A στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1* ανιχνεύτηκε σε μία ασθενή με C1-INH-HAE (chr11:57.372.148). Εξετάστηκαν τέσσερα ασθενή μέλη της οικογένειας της (3 άνδρες, 1 γυναίκα; μέσος όρος ηλικίας 39±13,4) και η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε μόνο στα δύο. Επιπρόσθετα, η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε τρεις ασθενείς με nC1-INH-HAE από την ομάδα ελέγχου (1 U-HAE, 1 ACEI-AAE, 1 δείγμα από ασθενή με επαναλαμβανόμενα επεισόδια αγγειοιδήματος και φυσιολογικό C1-INH αλλά με άγνωστο οικογενειακό ιστορικό που δεν πληρεί τα κριτήρια για INH-AAE).

#### **c.686-1333A>T**

Η μετάλλαξη c.686-1333A>T, η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.372.150), ανιχνεύτηκε σε δύο μη συγγενείς ασθενείς με C1-INH-HAE πολωνικής καταγωγής (48 και 63 χρονών). Εξετάστηκαν τέσσερα ασθενή μέλη μίας εκ των δύο οικογενειών και η μετάλλαξη εντοπίστηκε και στα τέσσερα άτομα (3 άνδρες, 1 γυναίκα; μέσος όρος ηλικίας 39±13,4). Επιπρόσθετα, ανιχνεύτηκε σε 28 nC1-INH-HAE (21 U-HAE, 1 ACEI-AAE, 2 INH-AAE, 4 δείγματα από ασθενείς με επαναλαμβανόμενα επεισόδια αγγειοιδήματος και φυσιολογικό C1-INH αλλά με άγνωστο οικογενειακό ιστορικό που δεν πληρεί τα κριτήρια για INH-AAE) και σε 6 υγιείς.

#### **c.1250-154C>G**

Η μετάλλαξη c.1250-154C>G, η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 7 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.381.647), ανιχνεύτηκε σε έναν 45-χρονο ασθενή ελληνικής καταγωγής με C1-INH-HAE. Εξετάστηκαν έξι μέλη της οικογένειας του (3 ασθενείς και 3 υγιείς; 3 άνδρες, 3 γυναίκες) και η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε έναν ασθενή και σε έναν υγιή.

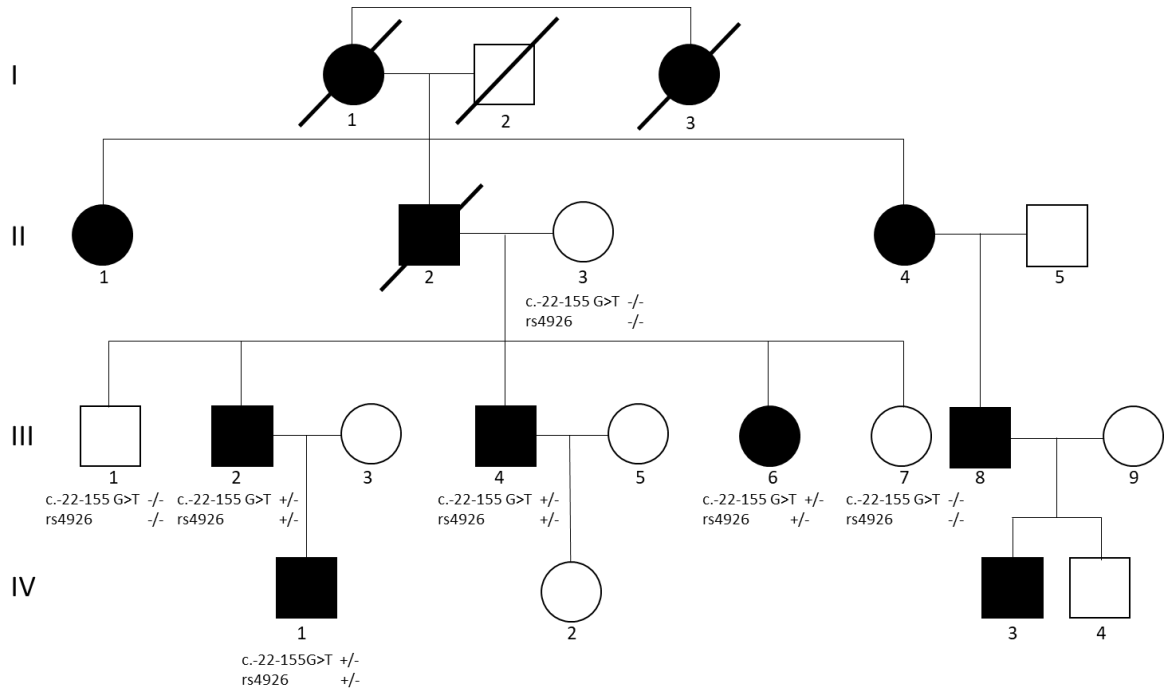
#### **c.-22-155G>T**

Η c.-22-155G>T, η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.365.567), ανιχνεύτηκε σε δύο Έλληνες ασθενείς με C1-INH-HAE, οι οποίοι ανήκουν σε δύο μη συγγενικές οικογένειες. Η μία εκ των δύο οικογενειών διερευνήθηκε περαιτέρω. Εξετάστηκαν συνολικά επτά μέλη της οικογένειας, τρεις υγιείς και τέσσερις ασθενείς (4 άνδρες, 3 γυναίκες) (**Εικόνα 10**). Η μετάλλαξη c.-22-155G>T ανιχνεύτηκε και στους τέσσερις ασθενείς με C1-INH-HAE, οι οποίοι ανήκουν σε δύο γενιές της οικογένειας, ενώ απουσίαζε από τα τρία υγιή μέλη της οικογένειας (**Εικόνα 11**). Οι ασθενείς IV<sub>3</sub>, III<sub>6</sub>, III<sub>2</sub>, III<sub>4</sub> ήταν ηλικίας 8, 40, 44 και 45 ετών (ο αρχικός ασθενής που προσήλθε για διερεύνηση), ενώ είχαν ηλικία έναρξης της νόσου 8, 7, 24 και 13 έτη, και με μέσο όρο συχνότητας επεισοδίων αγγειοιδήματος 2, 5, 14 και 5 επεισόδια ανά έτος, αντίστοιχα. Ο πέμπτος μη συγγενής ασθενής ήταν ένας άντρας 45 ετών χωρίς οικογενειακό ιστορικό αγγειοιδήματος, ο οποίος παρουσίαζε επεισόδια αγγειοιδήματος, κυρίως δερματικών, από την ηλικία των 25 ετών. Η ανεύρεση μελών της οικογένειας του για περαιτέρω διερεύνηση της μετάλλαξης κατέστη αδύνατη.

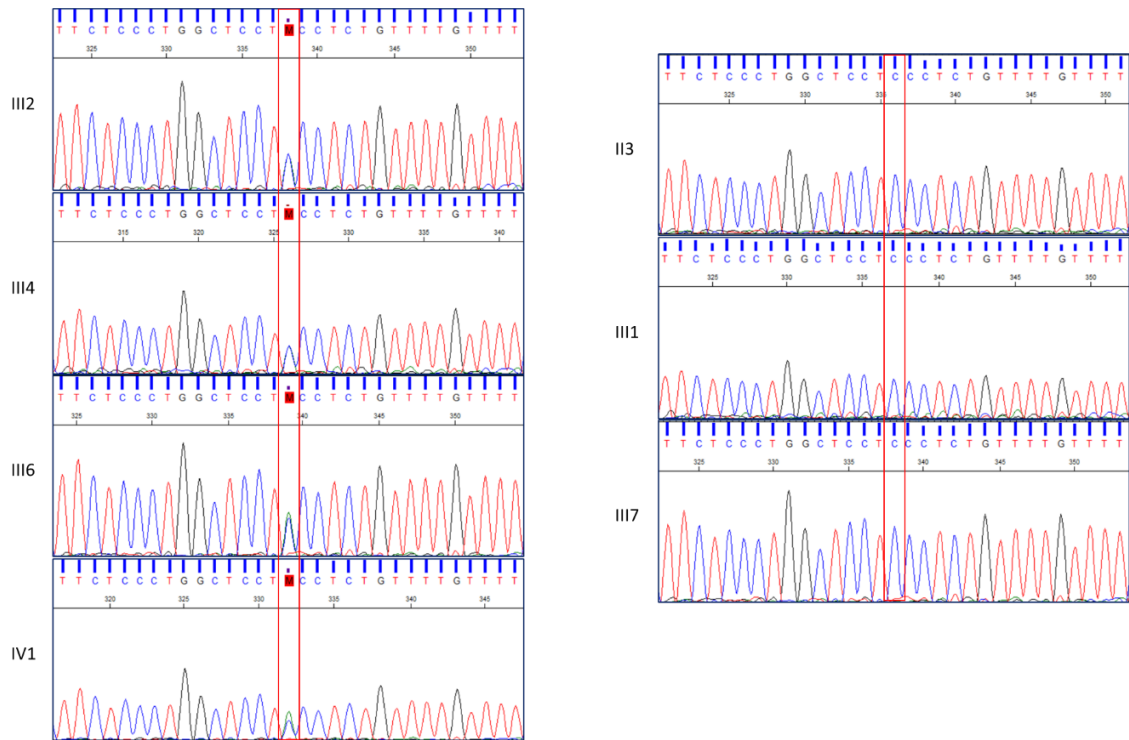
Σύμφωνα με τα βιοπληροφορικά εργαλεία NNSPLICE, NetGene 2, ASSP, FSPLICE και HSF η μετάλλαξη c.-22-155G>T πιθανόν να ενεργοποιεί μία νέα πιο ισχυρή 5' θέση ματίσματος από την κανονική στο ιντρόνιο 1, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα ενναλακτικό μετάγραφο. Με βάση τα εργαλεία CADD, Trar και DANN η μετάλλαξη προβλέπεται ως παθογονική. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP χαρακτηρίζει την περιοχή στην οποία λαμβάνει χώρα η μετάλλαξη ως μη ιδιαίτερα συντηρημένη. Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της μετάλλαξης χρησιμοποιήθηκε το βιοπληροφορικό εργαλείο SpliceAid 2 το οποίο έδειξε ότι η παραλλαγή c.-22-155G>T τροποποιεί το μεταγραφικό μοτίβο που αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F και hnRNP H3, που εμποδίζουν τη δέσμευσή τους στην αντίστοιχη γονιδιακή περιοχή

**(Εικόνα 12).**

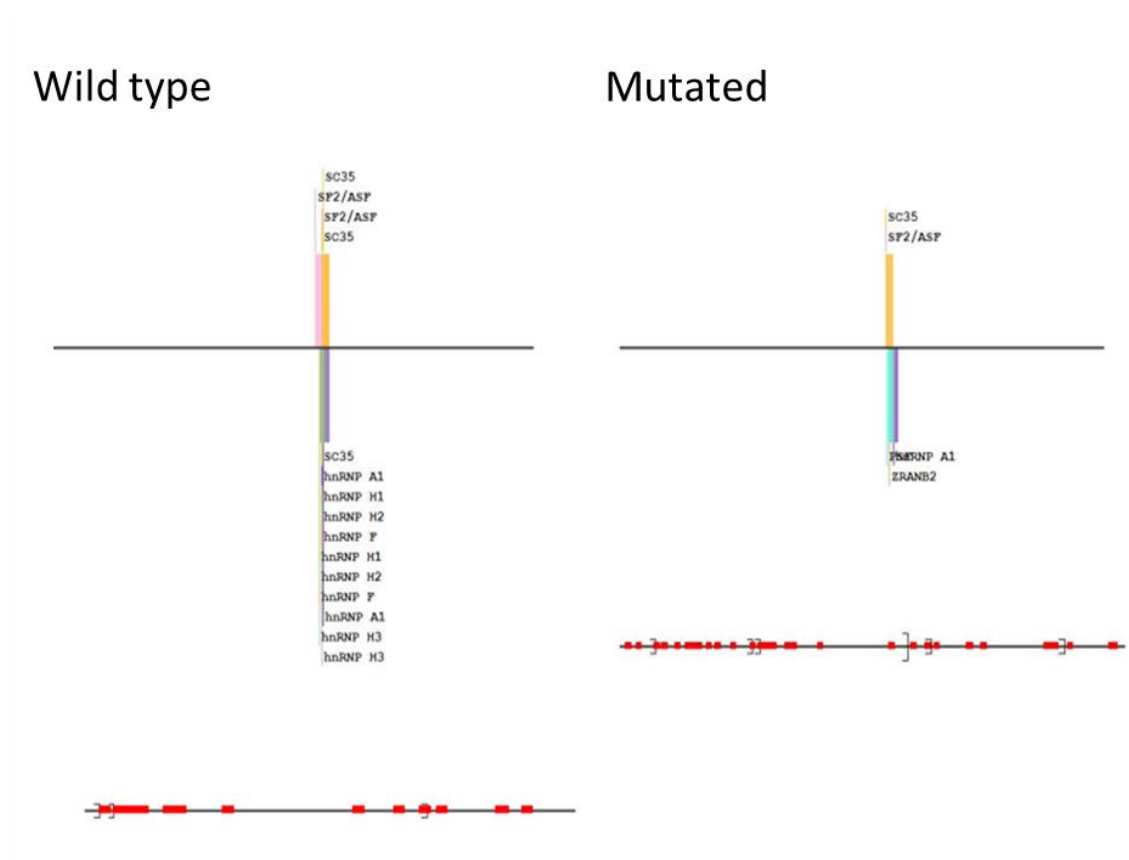
Η λειτουργική μελέτη της μετάλλαξης c.-22-155G>T έδειξε απώλεια της ετεροζυγωτίας για τον πολυμορφισμό rs4926 (c.1438G>A) στο εξώνιο 8 του γονιδίου *SERPING1*. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13**, στο gDNA, οι ασθενείς της εξεταζόμενης οικογένειας, οι οποίοι είναι φορείς της μετάλλαξης c.-22-155G>T, ήταν ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό rs4926 (c.1438G>A), ενώ όλα τα υγιή μέλη της οικογένειας ήταν ομόζυγα για τον άγριο τύπο (c.1438G). Αντιθέτως, στο cDNA, όλοι οι ασθενείς βρέθηκαν ομόζυγοι για τον άγριο τύπο c.1438G, καθώς υπήρχε μόνο το αλληλόμορφο (G).



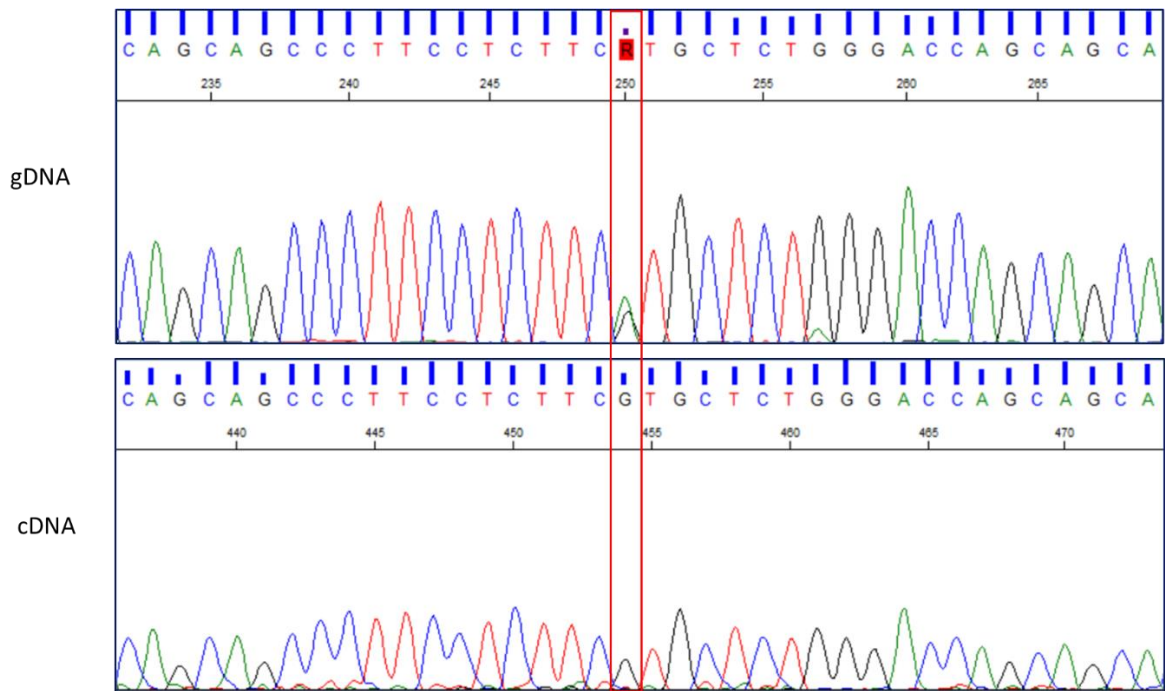
**Εικόνα 10:** Γενεαλογικό δέντρο της ελληνικής οικογένειας που φέρει τη μετάλλαξη c.-22-155G>T στο γονίδιο *SERPING1*. Επεισόδια αγγειοσιδήματος έχουν εμφανίσει οι I<sub>1</sub>, I<sub>3</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>4</sub>, III<sub>2</sub>, III<sub>4</sub>, III<sub>6</sub>, III<sub>8</sub>, IV<sub>1</sub> και IV<sub>3</sub>.



**Εικόνα 11:** Η μετάλλαξη c.-22-155G>T στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *SERPING1* όπως επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger σε επτά μέλη της ελληνικής οικογένειας. Η αρίθμηση των μελών της οικογένειας βασίζεται στο οικογενειακό τους δένδρο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 10**.



**Εικόνα 12:** Ανάλυση της επίδρασης της μετάλλαξης c.-22-155G>T με το βιοπληροφορικό εργαλείο SpliceAid 2.



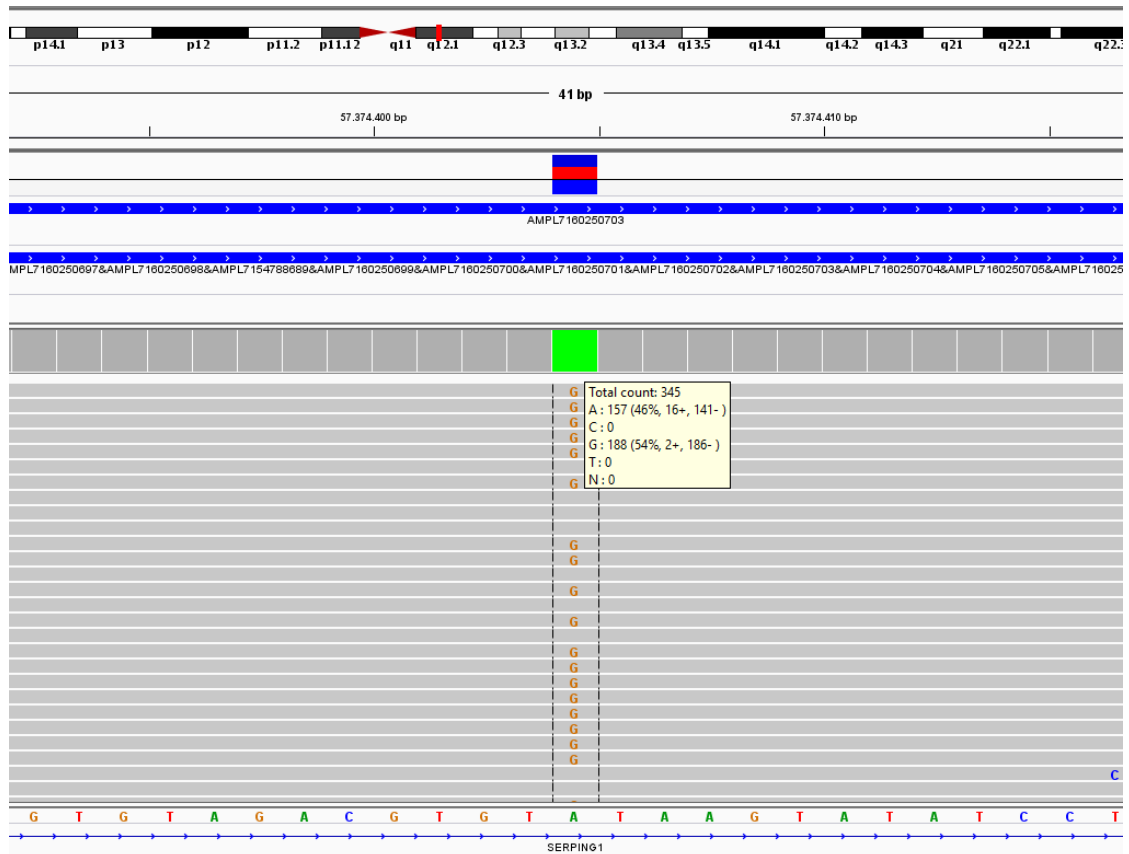
**Εικόνα 13:** Απώλεια της ετεροζυγωτία του πολυμορφισμού rs4926 (c.1438G>A) στους φορείς της μετάλλαξης c.-22-155G>T. Στο gDNA, οι ασθενείς της εξεταζόμενης οικογένειας οι οποίοι είναι φορείς της μετάλλαξης c.-22-155G>T ήταν ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό rs4926 (c.1438G>A), ενώ στο cDNA ήταν ομόζυγοι για τον άγριο τύπο c.1438G.

### c.1029+384A>G

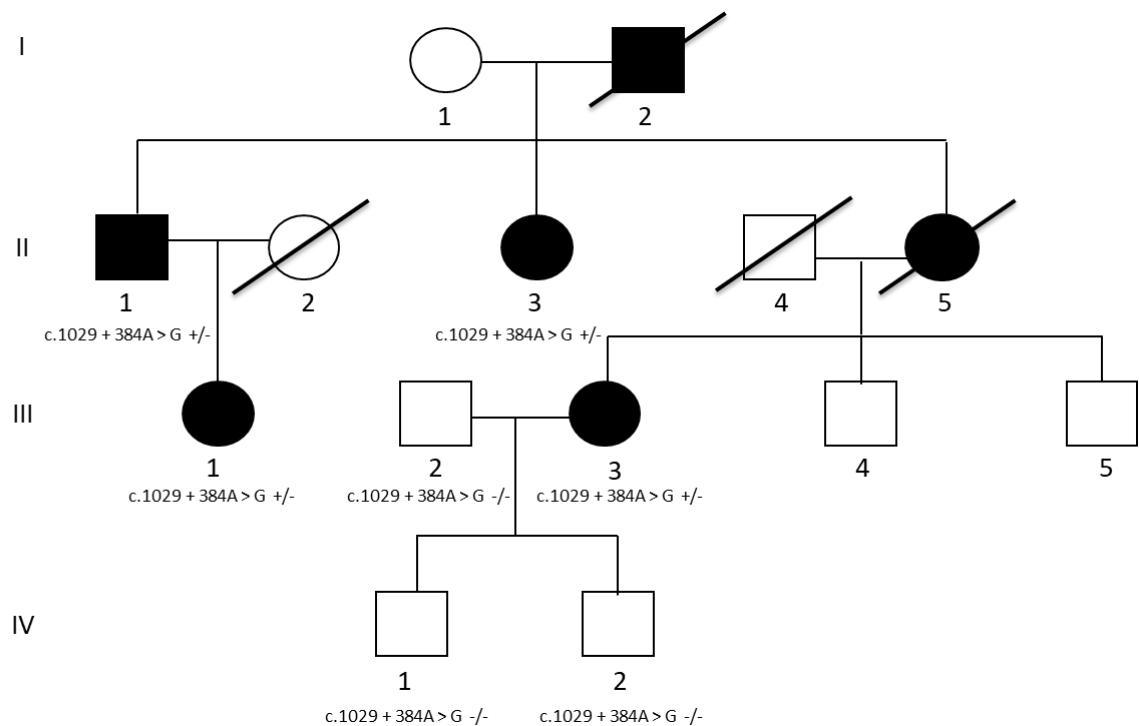
Η δημοσιευμένη παθογονική μετάλλαξη c.1029+384A>G στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* (chr11:57.374.404) εντοπίστηκε σε μία 43χρονη γυναίκα ασθενή με C1-INH-HAE (III<sub>3</sub>) ουγγρικής καταγωγής, η οποία παρακολουθούνταν στο ουγγρικό κέντρο αναφοράς για το αγγειοίδημα από την ηλικία των 3 ετών, όταν διαγνώστηκε για πρώτη φορά (**Εικόνα 14**). Ο παππούς της ασθενούς (I<sub>2</sub>) παρουσίαζε επίσης συμπτώματα αγγειοιδήματος, αλλά απεβίωσε στην ηλικία των 50 ετών, πριν λάβει χώρα η διάγνωση του. Η μητέρα της (II<sub>5</sub>) απεβίωσε σε ηλικία 23 ετών από λαρυγγικό οίδημα που προκλήθηκε από το C1-INH-HAE. Από τα εναπομείναντα μέλη της οικογένειάς εξετάστηκαν τρεις ασθενείς με C1-INH-HAE (II<sub>1</sub>, II<sub>3</sub> και III<sub>1</sub>) και τρεις υγιείς (III<sub>2</sub>, IV<sub>1</sub> και IV<sub>2</sub>) (**Εικόνα 15**). Η μετάλλαξη c.1029+384A>G ανιχνεύτηκε στους ασθενείς, ενώ δεν ανιχνεύτηκε στα υγιή μέλη της οικογένειας που εξετάστηκαν (**Εικόνα 16**).

Ο ασθενής II<sub>1</sub> παρουσίαζε ήπια συμπτωματολογία με έξι περίπου επεισόδια αγγειοιδήματος κατά την περίοδο 22 ετών. Έχει υποστεί οξεία θεραπεία με πλασματοποιημένο C1-INH κατά τη διάρκεια των επεισοδίων αγγειοιδήματος. Οι ασθενείς II<sub>3</sub> και III<sub>1</sub> παρουσίαζαν βαριά συμπτωματολογία καθώς έχουν κατά μέσο όρο δώδεκα επεισόδια αγγειοιδήματος τον χρόνο. Σε αυτές τις περιπτώσεις, εισήχθη μακροχρόνια θεραπευτική προφύλαξη.

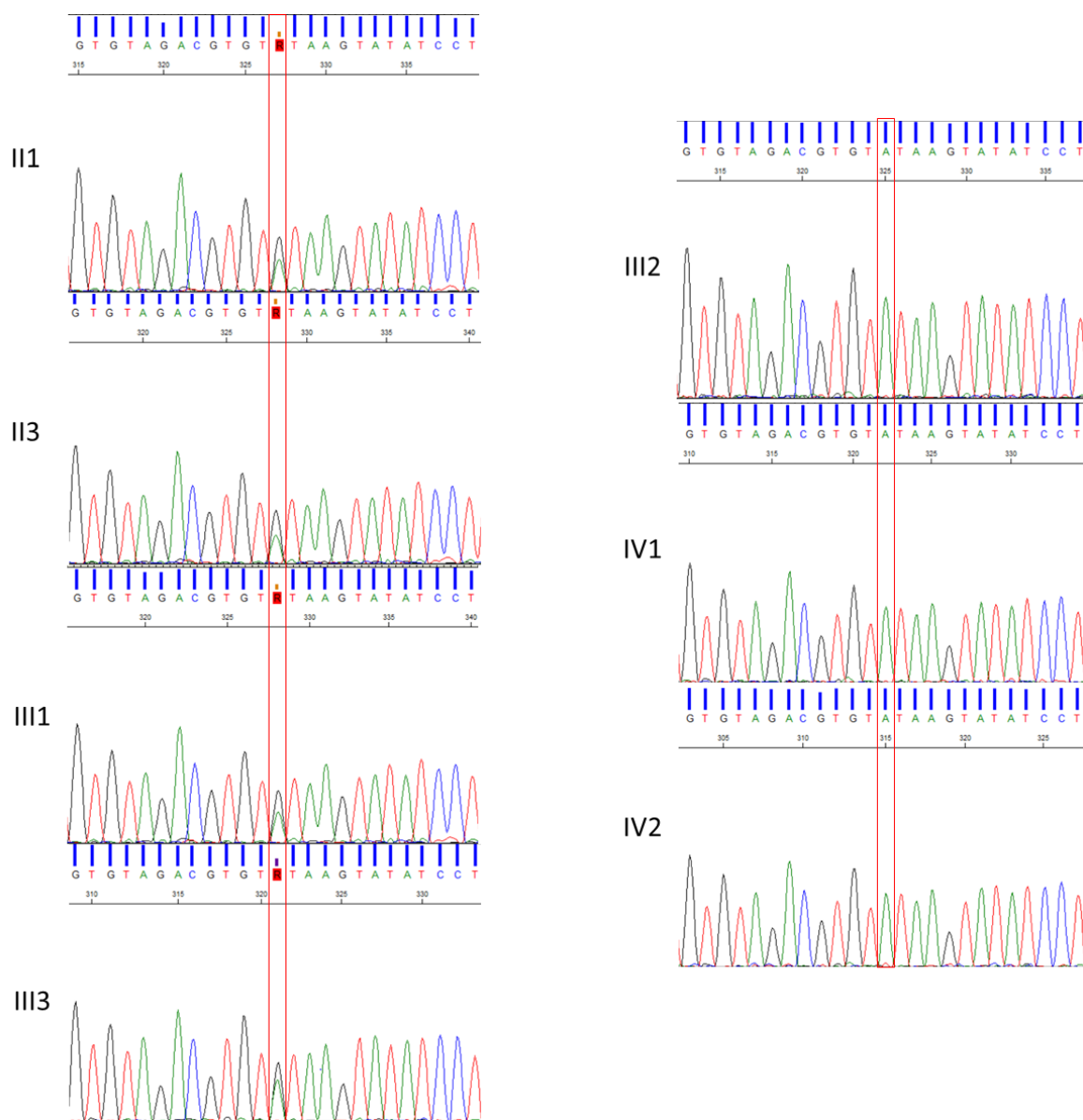
Σύμφωνα με τα βιοπληροφορικά εργαλεία NNSPLICE, NetGene 2, ASSP, FSPLICE και HSF η μετάλλαξη c.1029+384A>G πιθανόν να ενεργοποιεί μία νέα πιο ισχυρή 5' θέση ματίσματος από την κανονική στο ιντρόνιο 6, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός εναλλακτικού μεταγράφου. Το εργαλείο CADD χαρακτηρίζει τη μετάλλαξη ως καλοήγη, ενώ τα εργαλεία Trap και DANN χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη ως ουδέτερη. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP χαρακτηρίζει την περιοχή στην οποία λαμβάνει χώρα η μετάλλαξη ως μη συντηρημένη.



**Εικόνα 14:** Η μετάλλαξη c.1029+384A>G στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1*. Στην εικόνα απεικονίζεται το αποτέλεσμα που εξάγεται από το NGS.



**Εικόνα 15:** Γενεαλογικό δέντρο της συγγρικής οικογένειας που φέρει τη μετάλλαξη c.1029+384A>G στο γονίδιο *SERPING1*. Επεισόδια αγγειοιδήματος έχουν εμφανίσει οι I<sub>2</sub>, II<sub>1</sub>, II<sub>3</sub>, II<sub>5</sub>, III<sub>1</sub>, III<sub>3</sub>. Οι ασθενείς I<sub>2</sub> και II<sub>5</sub> δεν μπόρεσαν να εξεταστούν για την ύπαρξη της μετάλλαξης καθώς δεν βρίσκονται εν ζωή.



**Εικόνα 16:** Η μετάλλαξη c.1029+384A>G στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* όπως επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger σε επτά μέλη της συγγερικής οικογένειας. Η αρίθμηση των μελών της οικογένειας βασίζεται στο οικογενειακό τους δένδρο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 15**.

### c.890-14C>G

Η c.890-14C>G, η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 5 του γονιδίου *SERPING1* (chr11: 57.373.867), ανιχνεύτηκε σε μία Ελληνίδα ασθενή με C1-INH-HAE (**Εικόνα 17**). Εξετάστηκαν συνολικά επτά μέλη της οικογένειας, δύο υγιείς και πέντε ασθενείς (3 άνδρες, 4 γυναίκες). Η μετάλλαξη c.890-14C>G ανιχνεύτηκε και στους πέντε ασθενείς με C1-INH-HAE, ενώ απουσίαζε από τα δυο υγιή μέλη της οικογένειας (**Εικόνα 18**, **Εικόνα 19**). Οι ασθενείς III<sub>2</sub>, III<sub>5</sub>, III<sub>21</sub>, IV<sub>6</sub> και IV<sub>9</sub> ήταν ηλικίας 67, 54, 67, 30 και 33 ετών (ο αρχικός ασθενής που προσήλθε για διερεύνηση), αντίστοιχα. Επίσης με κληρονομικό αγγειοοίδημα είχαν διαγνωστεί οι I<sub>2</sub>, I<sub>5</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>14</sub>, II<sub>16</sub>, III<sub>24</sub>, αλλά δεν μπόρεσαν να εξεταστούν για την ύπαρξη της μετάλλαξης καθώς δεν βρίσκονται πλέον εν ζωή.

Ο ασθενής III<sub>2</sub> εμφάνισε για πρώτη φορά συμπτώματα στην ηλικία των 57 ετών στο δέρμα, ενώ κατά τη διάρκεια της ζωής του έχει εμφανίσει μία φορά λαρυγγικό οίδημα. Ο ασθενής III<sub>5</sub> είχε

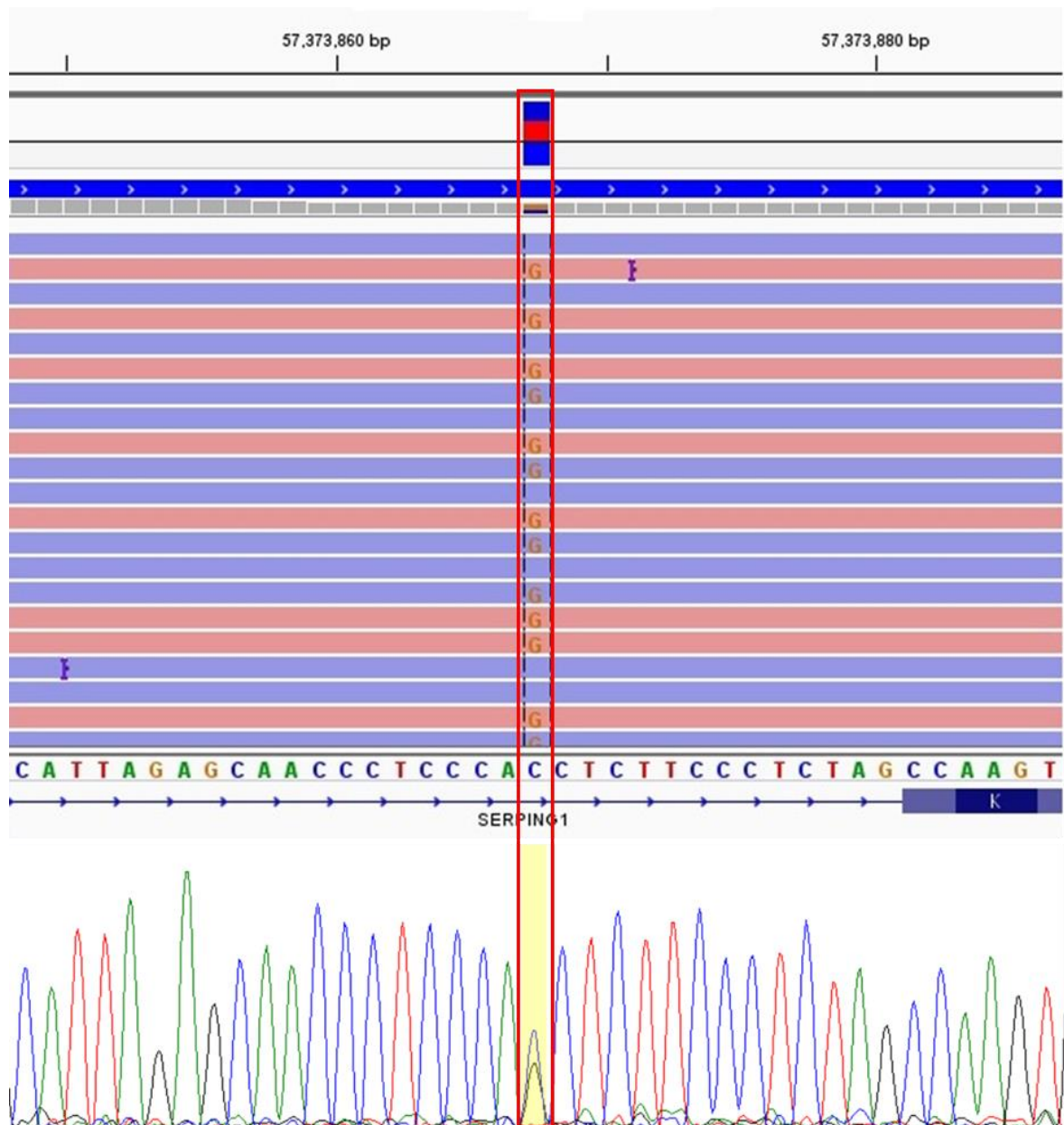


το πρώτο επεισόδιο αγγειοιδήματος στην ηλικία των τεσσάρων ετών, ενώ στην ηλικία των 45 εμφάνισε για πρώτη φορά λαρυγγικό οίδημα. Από τότε έχει πενήντα επεισόδια λαρυγγικού οιδήματος. Ο ασθενής III<sub>21</sub> εμφάνισε για πρώτη φορά συμπτώματα στο πεπτικό στην ηλικία των 18, ενώ από τότε έχει εμφανίσει πέντε φορές στη ζωή του λαρυγγικό οίδημα. Τέλος, ο ασθενής IV<sub>6</sub> είχε ηλικία εμφάνισης του πρώτου επεισοδίου κληρονομικού αγγειοιδήματος τα δώδεκα χρόνια με δερματικό οίδημα.

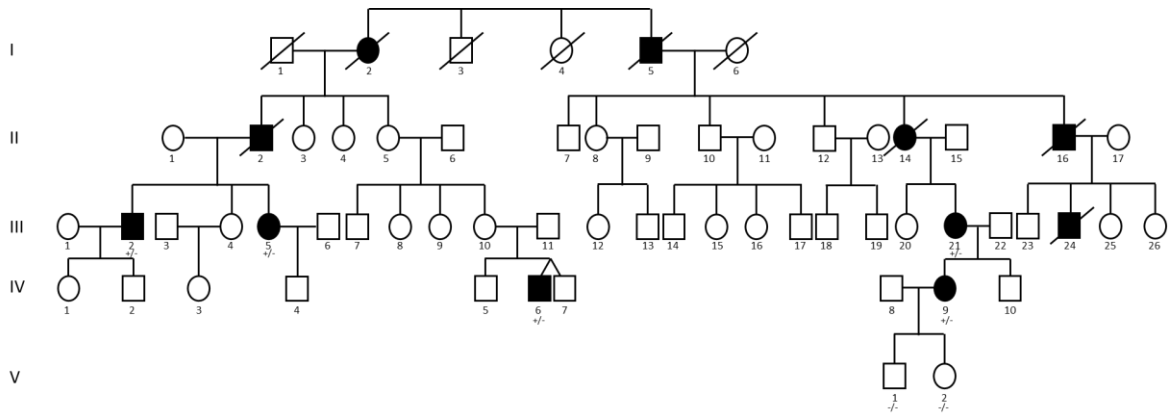
Τα βιοπληροφορικά εργαλεία HSF και NetGene 2 υποστήριξαν ότι η μετάλλαξη c.890-14C>G πιθανόν να δημιουργεί μία νέα 3' θέσης ματίσματος πριν από την κανονική 3' θέση ματίσματος στο ιντρόνιο 5. Σε αντίθεση, τα βιοπληροφορικά εργαλεία NNSPLICE, ASSP και FSPLICE υποστήριξαν ότι η μετάλλαξη δεν έχει καμία επίδραση στο επίπεδο της μεταγραφής. Το CADD χαρακτηρίζει τη μετάλλαξη ως καλοήγη, ενώ το Trar και το DANN δίνουν ένα ενδιάμεσο αποτέλεσμα, χωρίς να μπορούν να διακρίνουν πλήρως την επίπτωση της μετάλλαξης. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP χαρακτηρίζει την περιοχή στην οποία λαμβάνει χώρα η μετάλλαξη ως μη συντηρημένη.

Για να διευρευνηθεί η ανάλυση εξετάστηκε η μετάλλαξη με ένα ακόμα βιοπληροφορικό εργαλείο, το SpliceAid 2, το οποίο έδειξε ότι η παραλλαγή c.890-14C>G τροποποιεί το μεταγραφικό μοτίβο που αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες hnRNP K, SRp20 και YB-1, που εμποδίζουν τη δέσμευσή τους στην αντίστοιχη γονιδιακή περιοχή (**Εικόνα 20**).

Η λειτουργική μελέτη για την μετάλλαξη c.890-14C>G, η οποία βασίστηκε στην απομόνωση mRNA από υγιή και ασθενή μέλη της οικογένειας και στη σύνθεση cDNA, έδειξε ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ του mRNA των ασθενών και των υγείων μεταξύ του εξωνίου 3 και του εξωνίου 6 (**Εικόνα 21**).



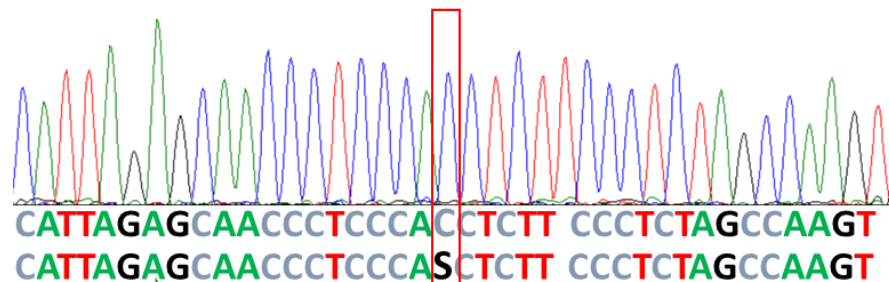
**Εικόνα 17:** Η μετάλλαξη c.890-14C>G στο ιντρόνιο 5 του γονιδίου *SERPING1* στο δείγμα IV<sub>6</sub>. Στην επάνω εικόνα απεικονίζεται το αποτέλεσμα που εξάγεται από το NGS, ενώ στην κάτω εικόνα απεικονίζεται η επιβεβαίωση με τη μέθοδο Sanger της μετάλλαξης στο γονίδιο *SERPING1*.



c.890-14C>G

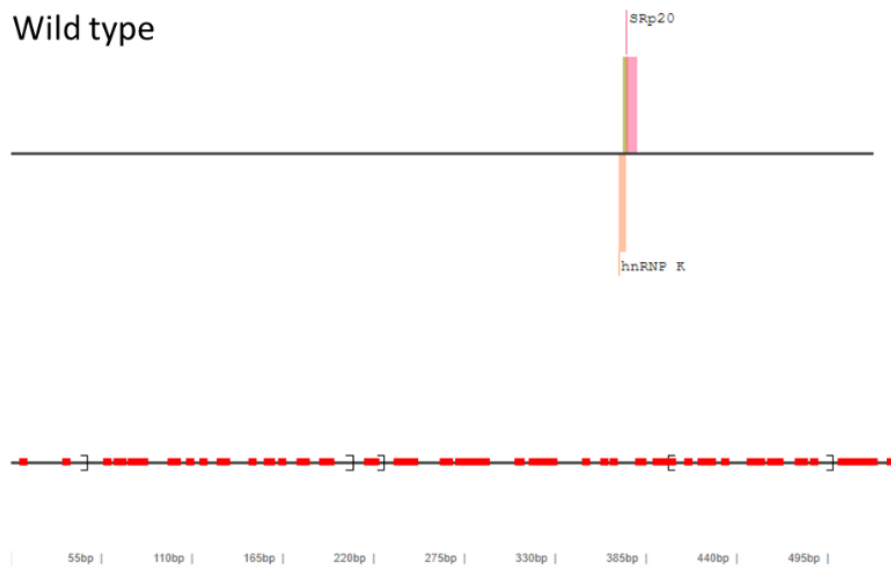
**Εικόνα 18:** Γενεαλογικό δέντρο της ελληνικής οικογένειας που φέρει τη μετάλλαξη c.890-14C>G στο ιντρόνιο 5 του γονιδίου *SERPING1*. Επεισόδια αγγειοιδήματος έχουν εμφανίσει οι I<sub>2</sub>, I<sub>5</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>14</sub>, II<sub>16</sub>, III<sub>2</sub>, III<sub>5</sub>, III<sub>21</sub>, IV<sub>6</sub> και IV<sub>9</sub>. Οι ασθενείς I<sub>2</sub>, I<sub>5</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>14</sub>, II<sub>16</sub>, III<sub>24</sub> δεν μπόρεσαν να εξεταστούν για την ύπαρξη της μετάλλαξης καθώς δεν βρίσκονται εν ζωή.

Wild type

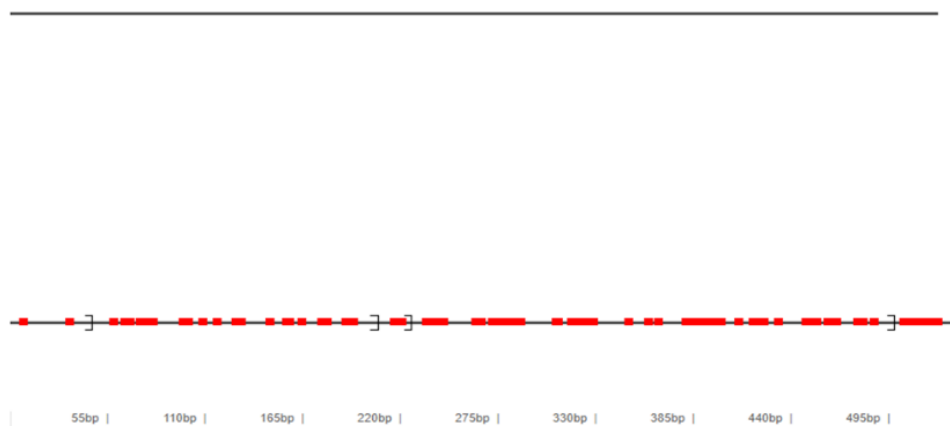


**Εικόνα 19:** Μέρος του χρωματογραφήματος που παρουσιάζει τη μετάλλαξη c.890-14C>G στο ιντρόνιο 5 του γονιδίου *SERPING1* στο δείγμα IV<sub>6</sub>.

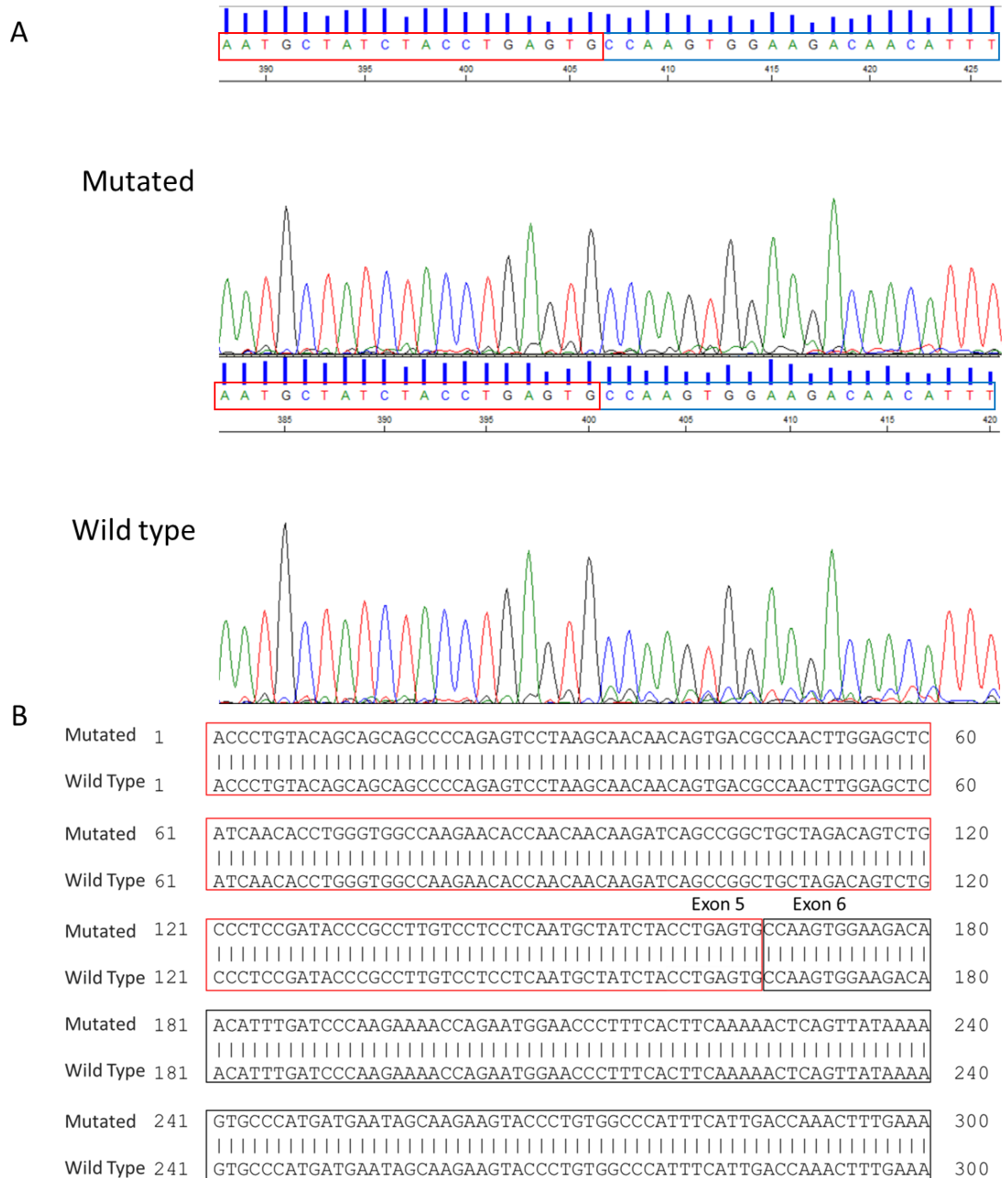
## Wild type



## Mutated



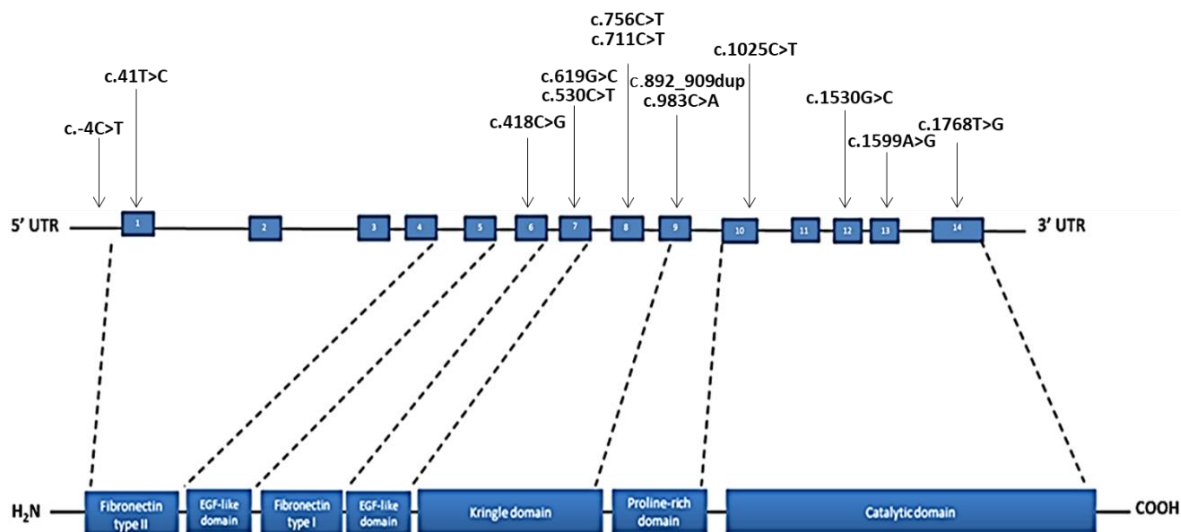
**Εικόνα 20:** Ανάλυση της επίδρασης της μετάλλαξης c.890-14C>G στο ιντρόνιο 5 του γονιδίου *SERPING1* με το βιοπληροφορικό εργαλείο SpliceAid 2.



**Εικόνα 21:** Σύγκριση του αποτελέσματος της αλληλούχησης του cDNA μεταξύ των υγείων και των ασθενών που φέρουν την μετάλλαξη c.890-14C>G στο ιντρόνιο 5 του γονιδίου *SERPING1*. Στην εικόνα A παρουσιάζεται μέρος του χρωματογραφήματος στην θέση σύνδεσης του εξωνίου 5 (κόκκινο χρώμα) με το εξώνιο 6 (μπλε χρώμα), ενώ στην εικόνα B παρουσιάζεται η σύγκριση των δύο αλληλουχιών όπως προέκυψε από την αλληλούχηση του cDNA.

## 6.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *F12*

Στα 358 δείγματα DNA από ασθενείς με κληρονομικό αγγειοίδημα που εξετάστηκαν για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *F12* ανιχνεύτηκαν δεκατρείς διαφορετικές μεταλλάξεις (δώδεκα σημειακές μεταλλάξεις και ένας διπλασιασμός). Όλες οι μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν παρουσιάζονται στην **Εικόνα 22**. Ο **Πίνακας 13** παρουσιάζει τις συχνότητες αλληλομόρφων και ο **Πίνακας 14** την βιοπληροφορική ανάλυση των μεταλλάξεων με τρία εργαλεία.



**Εικόνα 22:** Μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στο γονίδιο *F12*.

Δύο από τις παραλλαγές που ανιχνεύτηκαν είναι γνωστοί κοινοί πολυμορφισμοί, ο c.-4T>C (rs1801020) και ο c.619G>C (p.Ala207Pro, rs17876030).

### c.-4T>C

Ο λειτουργικός πολυμορφισμός c.-4T>C (rs1801020) στην 5' αμετάφραση περιοχή του γονιδίου *F12* ανιχνεύτηκε με συχνότητα αλληλίου 78,1%. Η συχνότητα αλληλομόρφου του πολυμορφισμού rs1801020 σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης στη βάση δεδομένων gnomAD είναι 75,38% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 65,22%. Υπάρχουν πέντε καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων ClinVar (Variation ID:1167) οι οποίες χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη αυτή ως καλοήγη για το κληρονομικό αγγειοίδημα (2 καταχωρήσεις) και την νόσο ανεπάρκειας του παράγοντα FXII (1 καταχώρηση). Το GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions 4,44, το οποίο υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη βρίσκεται σε μη συντηρημένη περιοχή καθώς η τιμή είναι κάτω από 5,5.

### c.619G>C

Ο πολυμορφισμός c.619G>C (p.Ala207Pro, rs17876030) στο εξώνιο 7 του γονιδίου *F12* ανιχνεύτηκε με συχνότητα αλληλίου 96,8%. Η συχνότητα αλληλομόρφου του πολυμορφισμού rs17876030 σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης στη βάση δεδομένων gnomAD είναι 98,67% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 95,15%. Υπάρχουν τέσσερις καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων ClinVar (Variation ID:256310) που χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη αυτή ως καλοήγη για το κληρονομικό αγγειοίδημα (1 καταχώρηση) και την νόσο ανεπάρκειας του παράγοντα FXII (1 καταχώρηση). Τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και PolyPhen2 προβλέπουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη ως ανεκτή και καλοήγη, αντίστοιχα. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP

rejected substitutions 2,0799, το οποίο είναι μικρότερο του 5,5 και άρα η περιοχή στην οποία ανιχνεύτηκε ο πολυμορφισμός c.619G>C δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη.

**Πίνακας 13:** Μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν στο γονίδιο *F12* και οι συχνότητες τους στον ευρωπαϊκό πληθυσμό (gnomAD) και στην παρούσα μελέτη.

Μετάλλαξη	Εξώνιο	dbSNP	gnomAD (EU)	nC1-INH-HAE (n=166)	C1-INH-HAE (n=161)
c.-4T>C	utr_5	rs1801020	75,38%	149 (76,20%)	151 (80,12%)
c.41T>C	1	rs143809932	0,002%	0 (<0,001%)	1 (0,31%)
c.418C>G	6	rs35515200	0,35%	2 (0,60%)	1 (0,31%)
c.530C>T	7	rs144821595	0,006%	2 (0,60%)	0 (<0,001%)
c.619G>C	7	rs17876030	98,67%	162 (95,78%)	160 (97,83%)
c.711C>T	8	rs17876047	3,17%	8 (2,40%)	6 (1,86%)
c.756C>T	8	rs41309752	0,48%	4 (1,20%)	5 (1,55%)
c.892_909 dup	9	rs774034606	<0,001%	1 (0,30%)	0 (<0,001%)
c.983C>A	9	rs118204456	<0,001%	2 (0,60%)	0 (<0,001%)
c.1025C>T	10	rs2230939	0,13%	0 (<0,001%)	1 (0,31%)
c.1530G>C	12	-	<0,001%	1 (0,30%)	0 (<0,001%)
c.1599A>G	13	rs1424350386	<0,001%	1 (0,30%)	0 (<0,001%)
c.1768T>G	14	-	<0,001%	1 (0,31%)	0 (<0,001%)

**Πίνακας 14:** Η εκτίμηση των μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν στο γονίδιο *F12* με βάση τρία βιοπληροφορικά εργαλεία. [NP, Not provided].

Μετάλλαξη	SIFT	PolyPhen2	GERP
c.-4T>C	NP	NP	4,44
c.41T>C	0	0,995	4,36
c.418C>G	0,51	0,896	2,0699
c.530C>T	0,51	0,002	-9,09
c.619G>C	0,29	0	2,0799
c.711C>T	NP	NP	-10,6
c.756C>T	NP	NP	-10,1
c.892_909 dup	NP	NP	-1,5179
c.983C>A	0,07	0,91	4,0599
c.1025C>T	0,42	0,001	-5,28
c.1530G>C	0,03	1	-1,74
c.1599A>G	NP	NP	-7,65
c.1768T>G	0	1	5,4099

Επιπρόσθετα, ανιχνεύτηκαν δύο κοινές συνώνυμες μεταλλάξεις στο εξώνιο 8 του γονιδίου *F12*, c.756C>T (rs41309752) και c.711C>T (rs17876047).

#### c.756C>T

Η μετάλλαξη c.756C>T ανιχνεύτηκε σε 4 δείγματα nC1-INH-HAE και σε 5 δείγματα C1-INH-HAE σε ετερόζυγη μορφή. Η συχνότητα αλληλομόρφου της μετάλλαξης c.756C>T σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης στη βάση δεδομένων gnomAD είναι 0,4830% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 1,389%. Υπάρχουν δύο καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων ClinVar που χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη αυτή ως καλοήγη για το κληρονομικό αγγειοίδημα και την νόσο ανεπάρκειας του

παράγοντα FXII. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions -10,1, το οποίο υποδηλώνει ότι η περιοχή στην οποία εντοπίζεται η μετάλλαξη δεν είναι καθόλου συντηρημένη. Καθώς η μετάλλαξη είναι συνώνυμη εξετάστηκε η επίπτωση της στη διαδικασία του ματίσματος με το βιοπληροφορικό εργαλείο HSF, το οποίο προέβλεψε ότι η μετάλλαξη δεν έχει σημαντικό αντίκτυπο στη διαδικασία του ματίσματος.

#### **c.711C>T**

Η συνώνυμη μετάλλαξη c.711C>T ανιχνεύτηκε σε 8 δείγματα nC1-INH-HAE και σε 6 δείγματα C1-INH-HAE σε ετερόζυγη μορφή. Η συχνότητα αλληλομόρφου της μετάλλαξης c.711C>T σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης στη βάση δεδομένων gnomAD είναι 3,165% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 2,275%. Στην βάση δεδομένων ClinVar υπάρχουν δύο καταχωρήσεις που χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη c.711C>T ως καλοήγη για το κληρονομικό αγγειοίδημα και την νόσο ανεπάρκειας του παράγοντα FXII. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions -10,6, το οποίο υποδηλώνει ότι η περιοχή της μετάλλαξης δεν είναι καθόλου συντηρημένη. Καθώς η μετάλλαξη είναι συνώνυμη εξετάστηκε η επίπτωση της στο μάτισμα με το εργαλείο HSF, το οποίο προέβλεψε ότι η μετάλλαξη προκαλεί αλλαγές στα μοτίβα ESE/ESS.

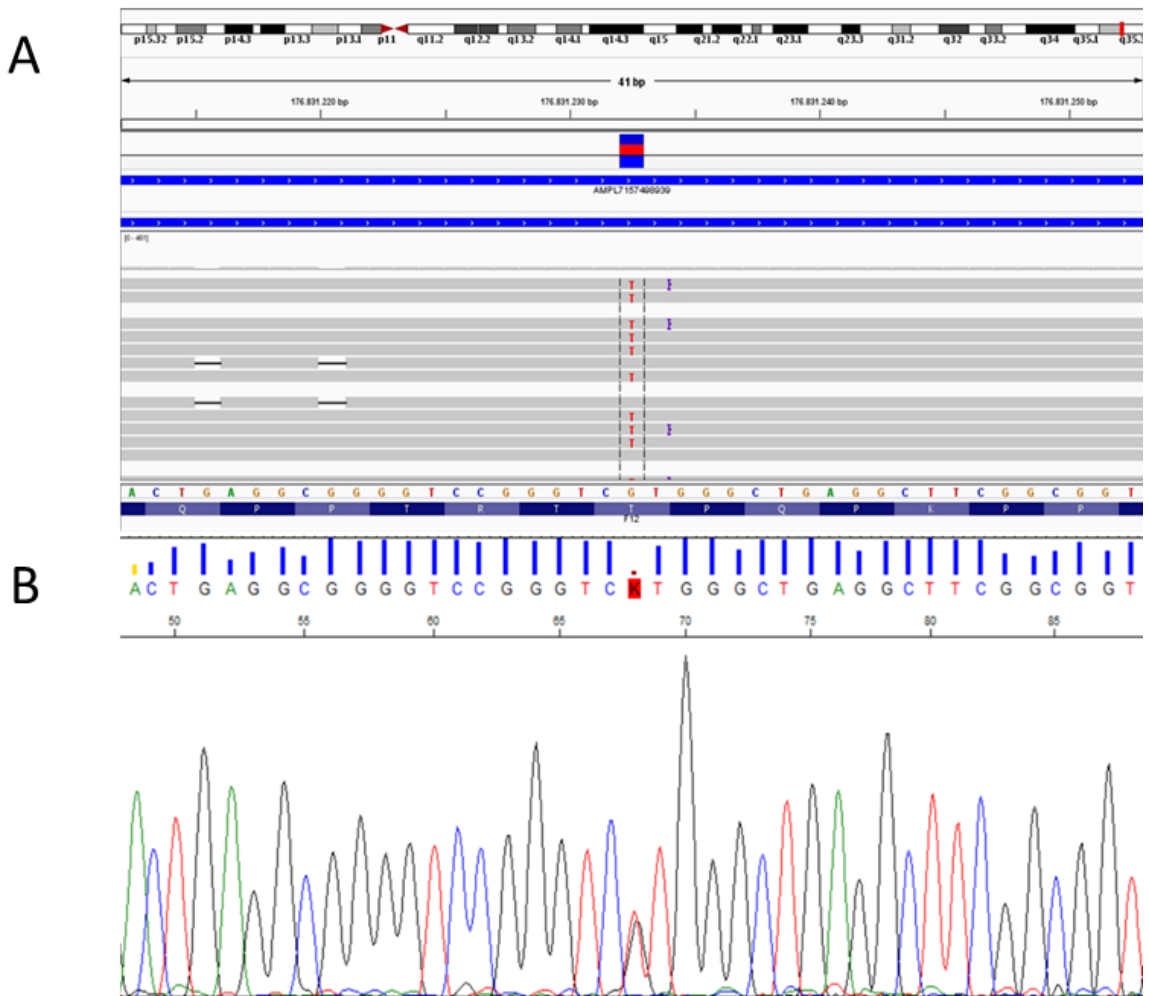
#### **c.1599A>G**

Σε έναν ασθενή ουγγρικής καταγωγής με U-HAE εντοπίστηκε μια σπάνια συνώνυμη μετάλλαξη στο εξώνιο 13, c.1599A>G (rs1424350386), που δεν έχει ανιχνευτεί στις 125.748 εξωνικές αλληλουχίες και στα 15.708 γονιδιώματα στη βάση gnomAD (<0,001%). Δεν εντοπίζεται κάποια καταχώρηση της παθογονικότητας της μετάλλαξης στη βάση δεδομένων του NCBI, ClinVar. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions -7,65, το οποίο υποδηλώνει ότι η περιοχή που βρίσκεται η παραλλαγή δεν είναι καθόλου συντηρημένη. Καθώς η μετάλλαξη είναι συνώνυμη εξετάστηκε η επίπτωση της στο μάτισμα με το εργαλείο HSF, το οποίο προέβλεψε ότι η μετάλλαξη πιθανόν να προκαλεί αλλαγές στα μοτίβα ESE/ESS.

#### **c.983C>A**

Η σημειακή παθογόνος μετάλλαξη c.983C>A (p.Thr328Lys, rs118204456) στο εξώνιο 9 του γονιδίου *F12* ανιχνεύτηκε σε τρεις γυναίκες ασθενείς με κληρονομικό αγγειοίδημα και φυσιολογικό αναστολέα C1 εστεράσης, που ανήκουν σε δύο μη συγγενείς ισπανικές οικογένειες (**Εικόνα 23**). Τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και PolyPhen2 χαρακτηρίζουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη ως ανεκτή και πιθανώς παθογονική, αντίστοιχα. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions 4,0599, το οποίο υποδηλώνει ότι η περιοχή που βρίσκεται η παραλλαγή δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη. Στην βάση δεδομένων ClinVar υπάρχουν τέσσερις καταχωρήσεις (Variation ID:1169) που χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη c.983C>A ως παθογονική σε συσχέτιση με το FXII-HAE. Επιπρόσθετα, η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει συσχετιστεί με το FXII-HAE σε πολλαπλές δημοσιεύσεις στη βάση δεδομένων Pubmed.

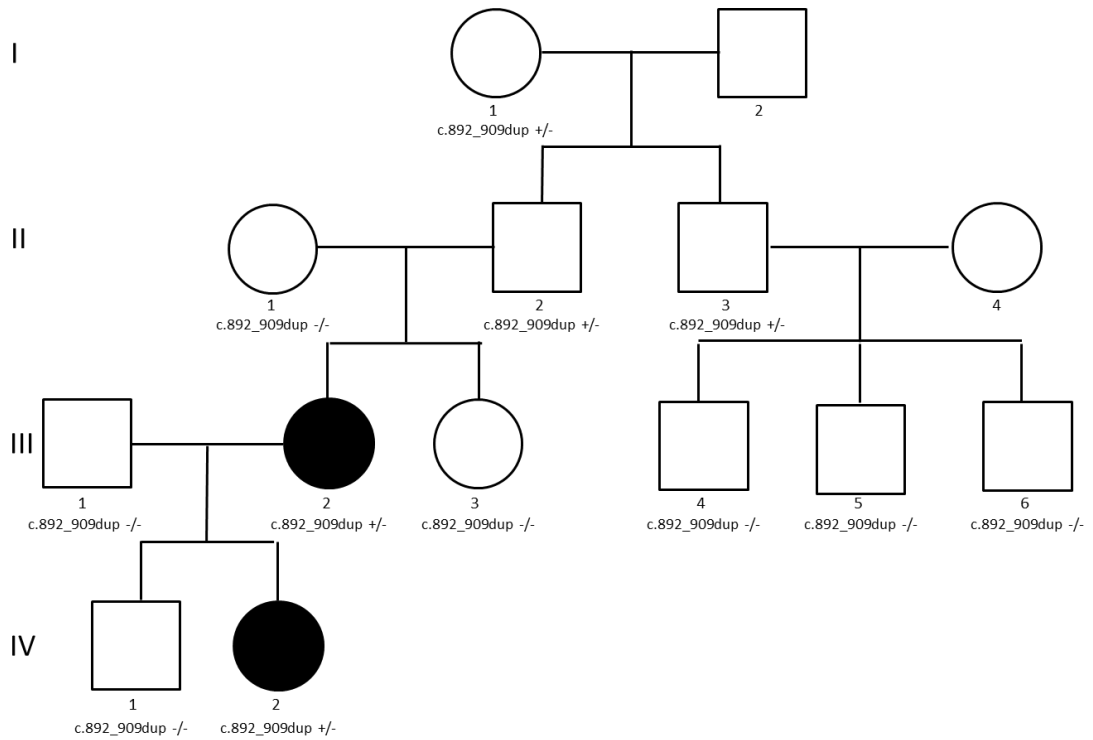




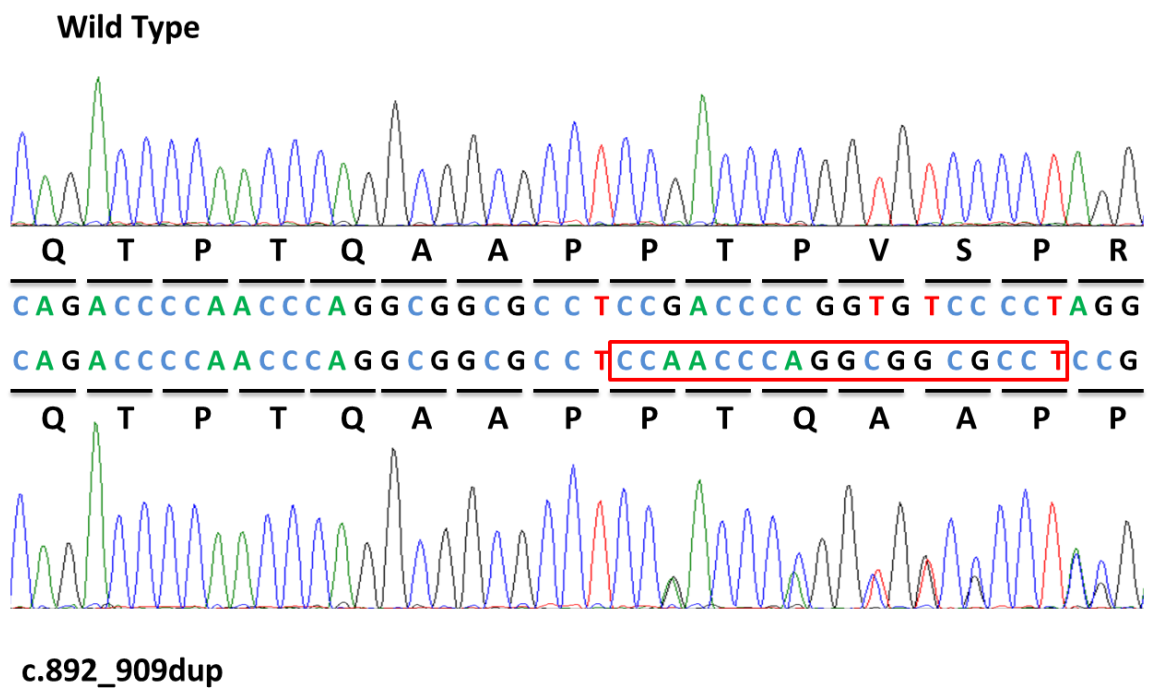
**Εικόνα 23:** Η μετάλλαξη c.983C>A στο εξώνιο 9 του γονιδίου *F12*. Στην εικόνα A απεικονίζεται το αποτέλεσμα που εξάγεται από το NGS, ενώ στην εικόνα B απεικονίζεται η επιβεβαίωση με τη μέθοδο Sanger της μετάλλαξης στο γονίδιο *F12*.

#### c.892\_909dup

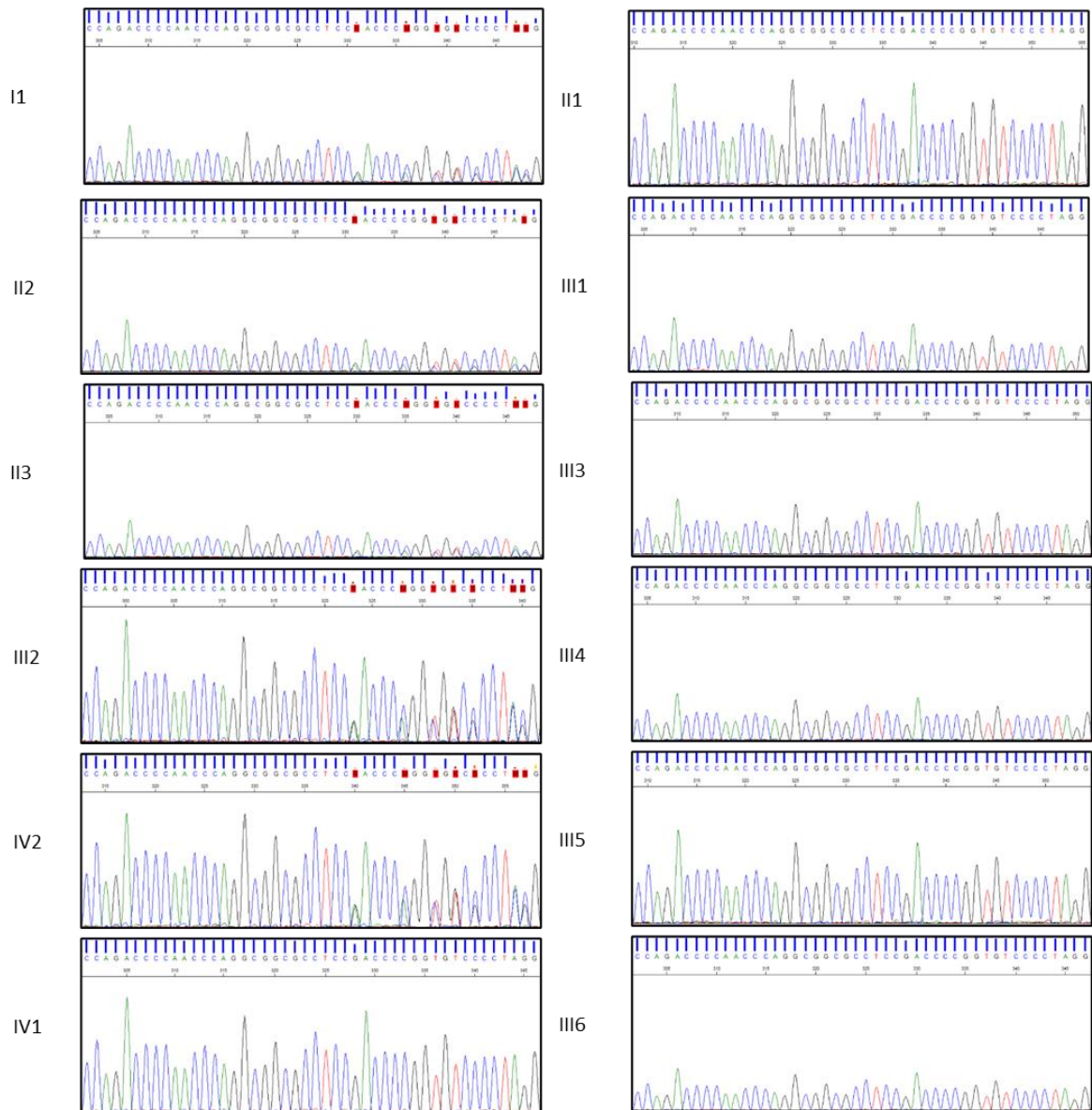
Η δημοσιευμένη παθογόνος μετάλλαξη c.892\_909dup στο εξώνιο 9 του γονιδίου *F12* ανιχνεύτηκε σε μία συγγική οικογένεια (**Εικόνα 24**). Εξετάστηκαν δώδεκα μέλη της οικογένειας (επτά άνδρες και πέντε γυναίκες). Η γυναίκα III<sub>2</sub> αποτελεί την πρωταρχική ασθενή, η οποία είχε εμφανίσει επεισόδια αγγειοιδήματος τρεις φορές τα τελευταία δύο χρόνια, συμπεριλαμβανομένου οιδήματος στο πρόσωπο και το φάρυγγα. Η κόρη της (IV<sub>2</sub>) είχε παρουσιάσει ένα μόνο επεισόδιο οιδήματος προσώπου σε ηλικία οκτώ ετών. Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας που εξετάστηκαν δεν έχουν εμφανίσει συμπτώματα αγγειοιδήματος. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions -1,5179, το οποίο υποδηλώνει ότι η περιοχή που βρίσκεται η παραλλαγή δεν είναι συντηρημένη. Ο διπλασιασμός των 18 bp εμφανίστηκε στα πέντε μέλη της οικογένειας σε ετερόζυγη μορφή (**Εικόνα 25**, **Εικόνα 26**).



**Εικόνα 24:** Γενεαλογικό δέντρο της συγγικής οικογένειας που φέρει την παθολόγο μετάλλαξη c.892\_909dup. Επεισόδια αγγειοιδήματος έχουν εμφανίσει μόνο η III<sub>2</sub> και η IV<sub>2</sub>.



**Εικόνα 25:** Μέρος του χρωματογραφήματος που παρουσιάζει τον διπλασιασμό των 18 bp στο εξώνιο 9 του γονιδίου *F12*.

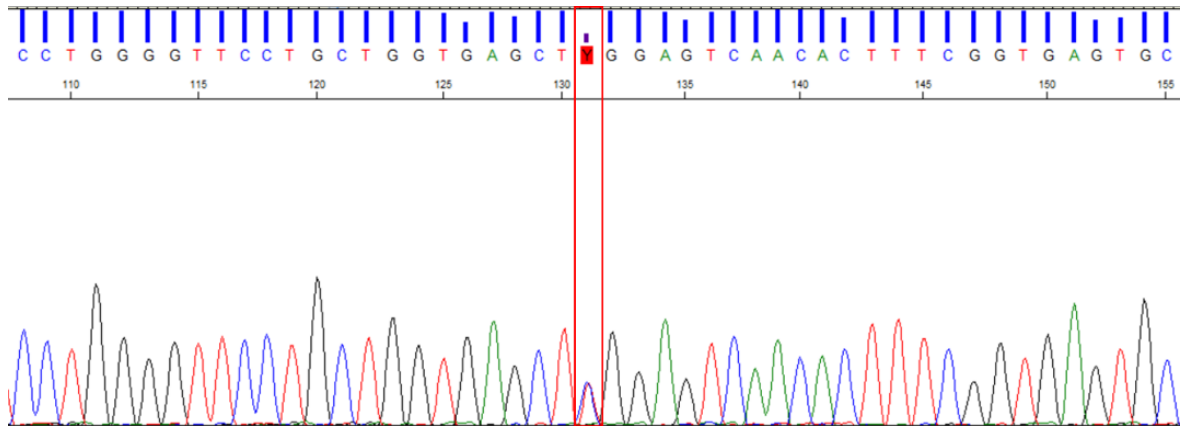


**Εικόνα 26:** Η μετάλλαξη c.892\_909dup στο εξώνιο 9 του γονιδίου *F12* όπως επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger σε δέκα μέλη της συγγερικής οικογένειας. Η αρίθμηση των μελών της οικογένειας βασίζεται στο οικογενειακό τους δένδρο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 24**.

Σε δύο διαφορετικούς ασθενείς με C1-INH-HAE τύπου I ανιχνεύτηκαν οι μεταλλάξεις c.41T>C (p.Leu14Ser, rs143809932) και c.1025C>T (p.Pro342Leu, rs2230939).

#### **c.41T>C**

Η μετάλλαξη c.41T>C εντοπίζεται στο εξώνιο 1 του γονιδίου *F12* σε έναν ασθενή βουλγαρικής καταγωγής (**Εικόνα 27**). Τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και PolyPhen2 προβλέπουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη ως επιβλαβής και πιθανώς παθογονική, αντίστοιχα. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions 4,36, το οποίο υποδηλώνει ότι η περιοχή που βρίσκεται η παραλλαγή δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη. Η συχνότητα αλληλομόρφου της μετάλλαξης c.41T>C σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης στη βάση δεδομένων gnomAD είναι 0,002% και στο παγκόσμιο πληθυσμό είναι 0,01556%. Δεν υπάρχει κάποια καταχώρηση στο ClinVar, η οποία να χαρακτηρίζει την μετάλλαξη αυτή ως προς την παθογονικότητα της.



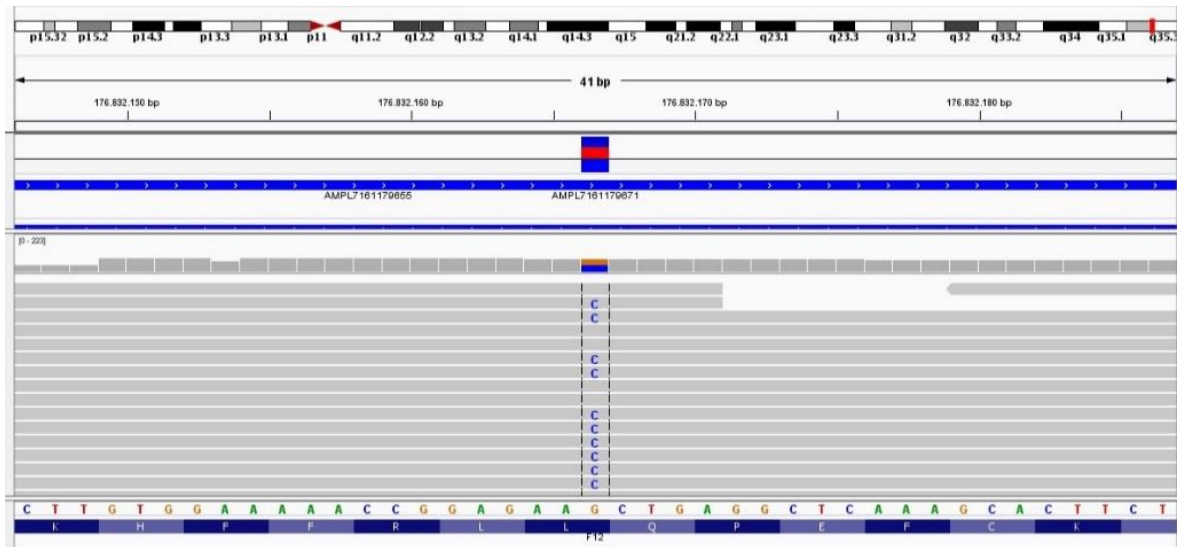
**Εικόνα 27:** Η μετάλλαξη c.41T>C στο εξώνιο 1 του γονιδίου *F12* όπως επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger σε έναν ασθενή βουλγαρικής καταγωγής.

### c.1025C>T

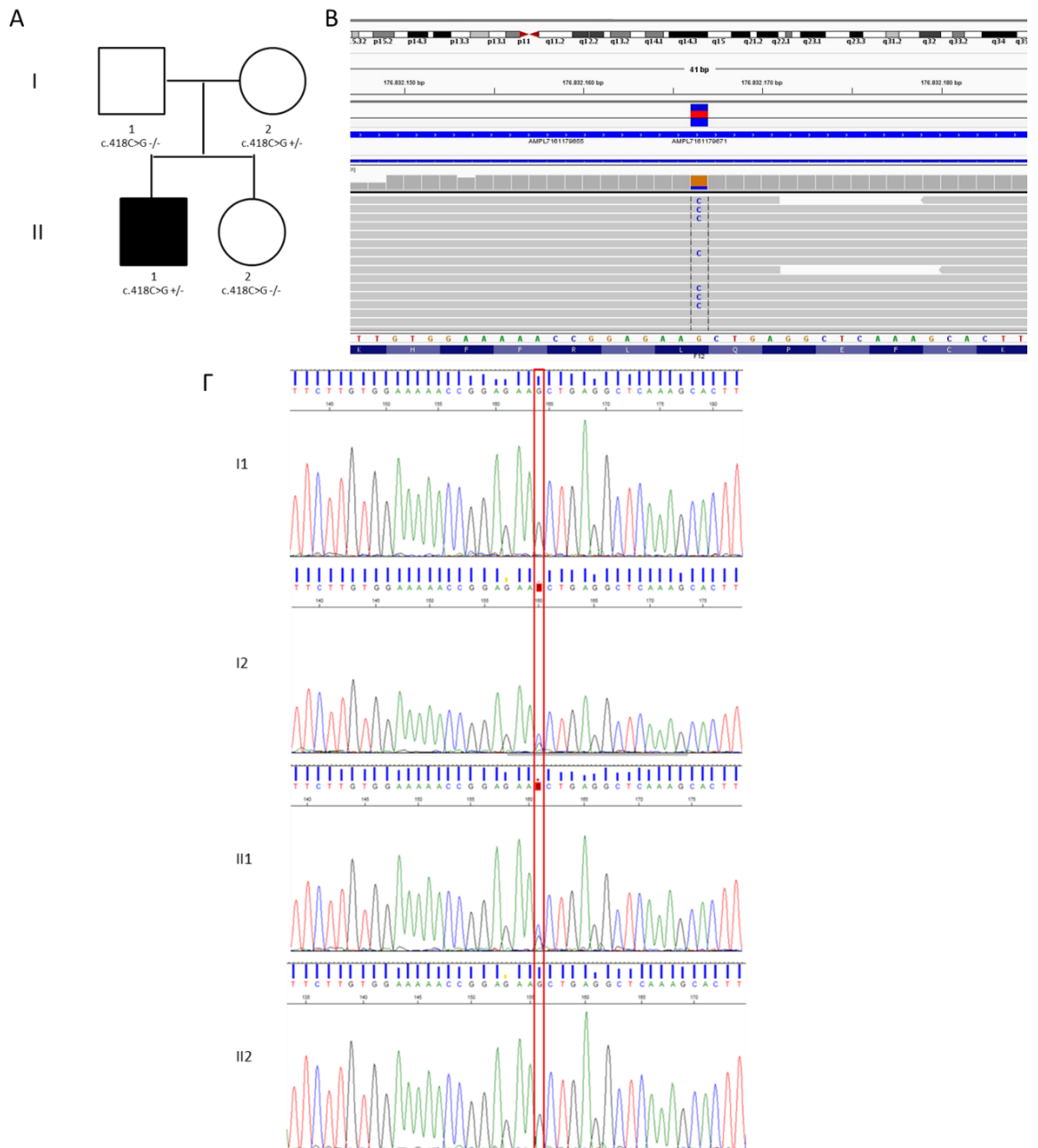
Όπως αναφέρθηκε, η μετάλλαξη c.1025C>T εντοπίστηκε στο εξώνιο 10 του γονιδίου *F12* σε έναν Πολωνό ασθενή με C1-INH-HAE τύπου I με παθογόνο μετάλλαξη στο γονίδιο *SERPING1*. Η μετάλλαξη εντοπίζεται σε τρεις διαφορετικές καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων ClinVar (Variation ID:352993) που την χαρακτηρίζουν ως καλοήγη για το FXII-HAE, πιθανώς καλοήγη και άγνωστης παθογονικότητας για τη νόσο ανεπάρκειας του παράγοντα FXII. Τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και PolyPhen2 την προβλέπουν ως ανεκτή και καλοήγη, αντίστοιχα. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions -5,28, το οποίο υποδηλώνει ότι η περιοχή στην οποία εντοπίζεται η παραλλαγή δεν είναι συντηρημένη. Η συχνότητα της μετάλλαξης c.1025C>T στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 0,13% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 0,07692% στη βάση δεδομένων gnomAD.

### c.418C>G

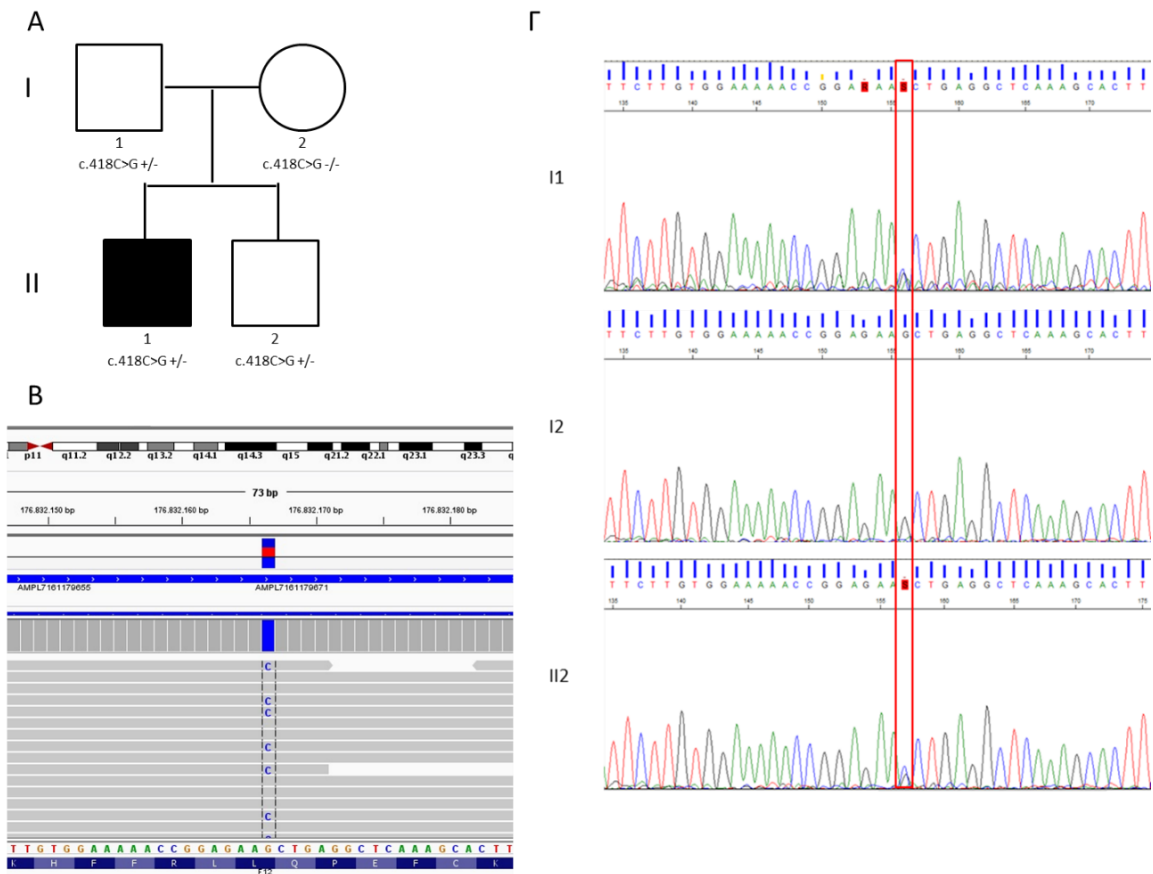
Η μετάλλαξη c.418C>G (p.Leu140Val, rs35515200) στο εξώνιο 6 του γονιδίου *F12* ανιχνεύθηκε σε έναν Γερμανό ασθενή με C1-INH-HAE τύπου I (**Εικόνα 28**) και δύο ασθενείς με U-HAE, έναν ιταλικής και έναν πολωνικής καταγωγής. Έλαβαν χώρα δύο οικογενειακές μελέτες για να διερευνηθεί η παθογονικότητα της μετάλλαξης c.418C>G. Στην ιταλική οικογένεια εξετάστηκαν τρία υγιή μέλη της οικογένειας και η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε στην υγιή μητέρα του ασθενή (I<sub>2</sub>) (**Εικόνα 29**). Στην πολωνική οικογένεια εξετάστηκαν τρία υγιή μέλη της οικογένειας και η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε στον πατέρα (I<sub>1</sub>) και τον αδερφό του ασθενή (II<sub>2</sub>) (**Εικόνα 30**). Τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και PolyPhen2 χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη ως ανεκτή και πιθανώς παθογονική, αντίστοιχα. Το εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions 2,0699, το οποίο υποδηλώνει ότι η περιοχή στην οποία βρίσκεται η μετάλλαξη δεν είναι συντηρημένη. Η συχνότητα της στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 0,35% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 0,2232% στη βάση δεδομένων gnomAD. Στη βάση δεδομένων ClinVar υπάρχουν τρεις καταχωρήσεις (Variation ID:353001) που χαρακτηρίζουν τη μετάλλαξη ως καλοήγη (1 καταχώρηση) σε συσχέτιση με το FXII-HAE και πιθανώς καλοήγη σε συσχέτιση με τη νόσο ανεπάρκειας του παράγοντα FXII (1 καταχώρηση) και μία καταχώρηση που χαρακτηρίζει τη μετάλλαξη ως πιθανώς καλοήγη χωρίς να διευκρινίζεται το νόσημα.



**Εικόνα 28:** Η μετάλλαξη c.418C>G στο εξώνιο 6 του γονιδίου *F12* όπως οπτικοποιείται στο πρόγραμμα IGV.



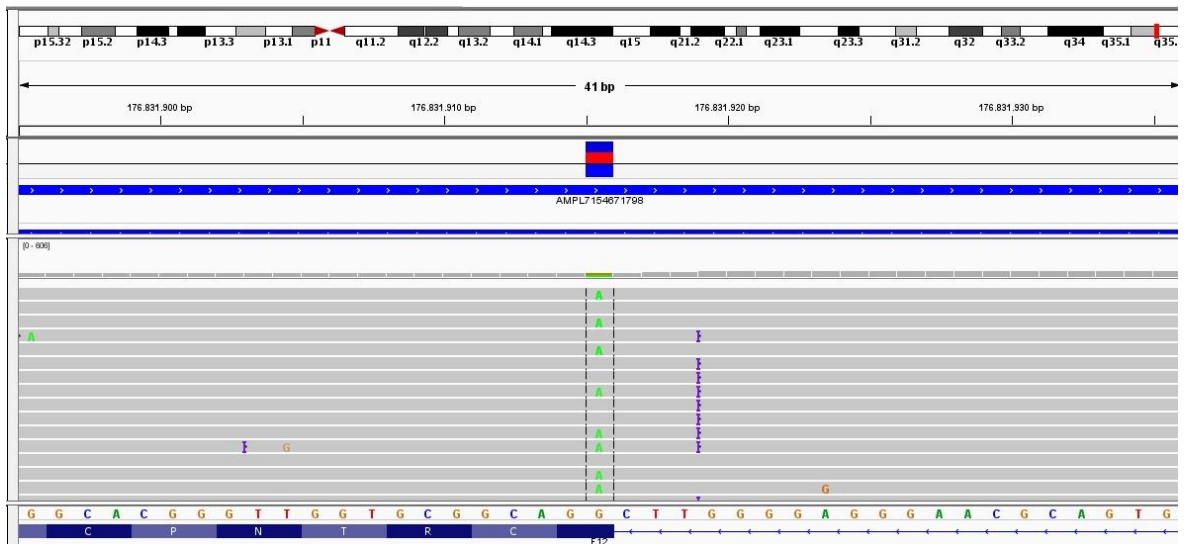
**Εικόνα 29:** Στην εικόνα A απεικονίζεται το γενεαλογικό δέντρο της ιταλικής οικογένειας που φέρει την μετάλλαξη c.418C>G στο εξώνιο 6 του γονιδίου *F12*. Επεισόδια αγγειοσιδήματος έχει εμφανίσει μόνο ο II<sub>1</sub>. Στην εικόνα B απεικονίζεται η μετάλλαξη c.418C>G στο εξώνιο 6 του γονιδίου *F12* όπως οπτικοποιείται στο πρόγραμμα IGV στον ασθενή II<sub>1</sub>. Στην εικόνα Γ απεικονίζεται η μετάλλαξη c.418C>G στο εξώνιο 6 του γονιδίου *F12* όπως επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στα τέσσερα μέλη της ιταλικής οικογένειας.



**Εικόνα 30:** Στην εικόνα A απεικονίζεται το γενεαλογικό δέντρο της πολωνικής οικογένειας που φέρει την μετάλλαξη c.418C>G στο εξώνιο 6 του γονιδίου *F12*. Επεισόδια αγγειοιδήματος έχει εμφανίσει μόνο ο II<sub>1</sub>. Στην εικόνα B απεικονίζεται η μετάλλαξη c.418C>G στο εξώνιο 6 του γονιδίου *F12* όπως οπτικοποιείται στο πρόγραμμα IGV στον ασθενή II<sub>1</sub>. Στην εικόνα Γ απεικονίζεται η μετάλλαξη c.418C>G στο εξώνιο 6 του γονιδίου *F12* όπως επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στα τρία μέλη της πολωνικής οικογένειας.

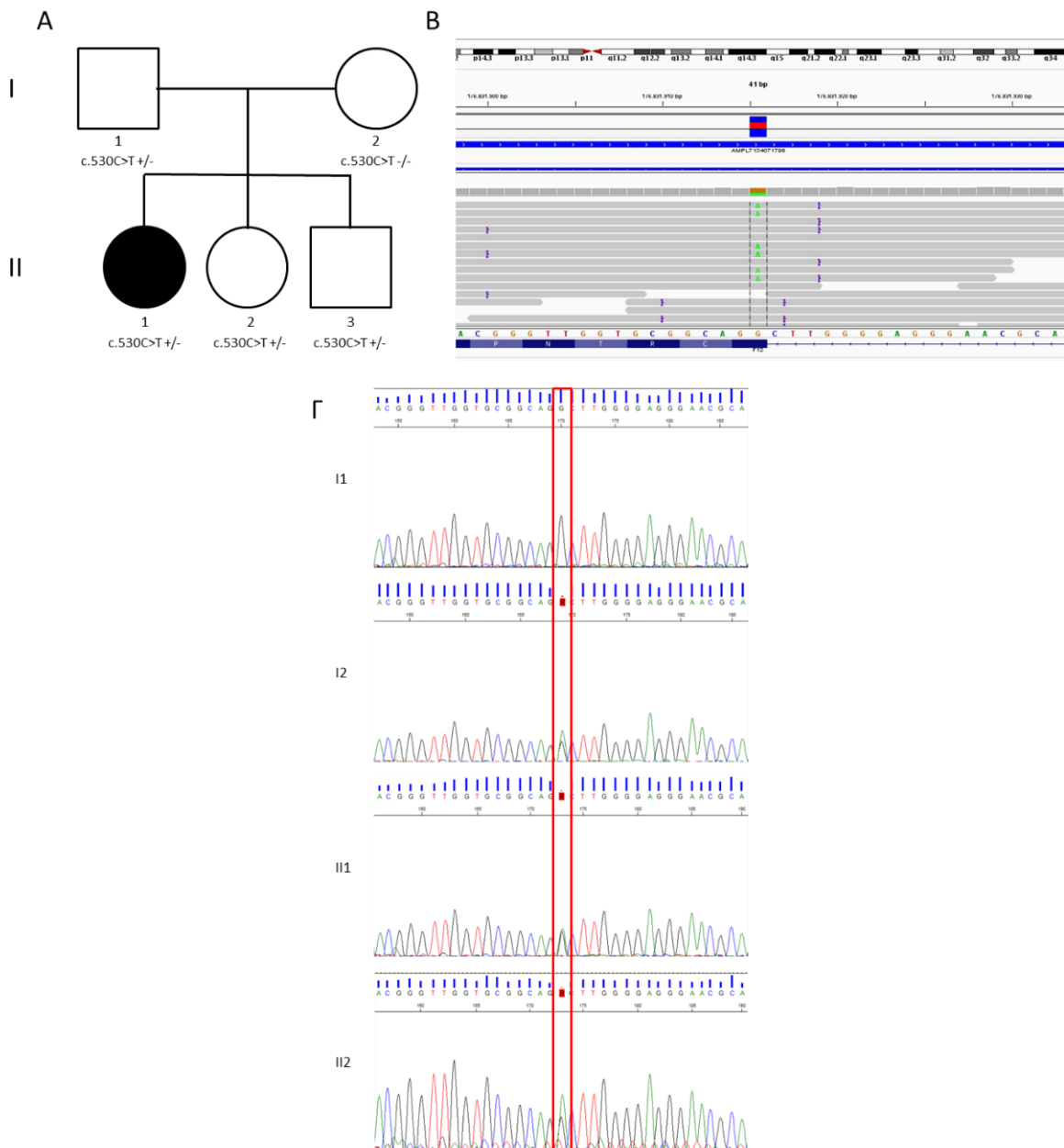
### c.530C>T

Η μετάλλαξη c.530C>T (p.Ala177Val, rs144821595) ανιχνεύθηκε σε δύο ασθενείς με U-HAE, έναν ισπανικής και έναν ιταλικής καταγωγής. Η μετάλλαξη c.530C>T εντοπίζεται στο εξώνιο 7 του γονιδίου *F12* (**Εικόνα 31**). Έλαβε χώρα μία οικογενειακή μελέτη με σκοπό την ανίχνευση της μετάλλαξης c.530C>T. Στην ισπανική οικογένεια εξετάστηκαν τέσσερα υγιή μέλη της οικογένειας και η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε στον υγιή πατέρα, στην υγιή αδερφή και στον υγιή αδερφό της ασθενούς (**Εικόνα 32**). Τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και PolyPhen2 προβλέπουν την μετάλλαξη ως ανεκτή και καλοήθης, αντίστοιχα. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions -9,09, το οποίο υποδηλώνει ότι η περιοχή στην οποία βρίσκεται η μετάλλαξη δεν είναι καθόλου συντηρημένη. Η συχνότητα της στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 0,005960% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 0,004474%. Στη βάση δεδομένων ClinVar δεν υπάρχει καταχώρηση της συγκεκριμένης μετάλλαξης ως προς την παθογονικότητα της.



**Εικόνα 31:** Η μετάλλαξη c.530C>T στο εξώνιο 7 του γονιδίου *F12* όπως οπτικοποιείται στο πρόγραμμα IGV στον ασθενή με U-ΗΑΕ ιταλικής καταγωγής.





**Εικόνα 32:** Στην εικόνα A απεικονίζεται το γενεαλογικό δέντρο της ισπανικής οικογένειας που φέρει την μετάλλαξη *c.530C>T* στο εξώνιο 7 του γονιδίου *F12*. Επεισόδια αγγειοιδήματος έχει εμφανίσει μόνο ο II<sub>1</sub>. Στην εικόνα B απεικονίζεται η μετάλλαξη *c.530C>T* στο εξώνιο 7 του γονιδίου *F12* όπως οπτικοποιείται στο πρόγραμμα IGV στον ασθενή II<sub>1</sub>. Στην εικόνα Γ απεικονίζεται η μετάλλαξη *c.530C>T* στο εξώνιο 7 του γονιδίου *F12* όπως επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στα τέσσερα μέλη της ισπανικής οικογένειας.

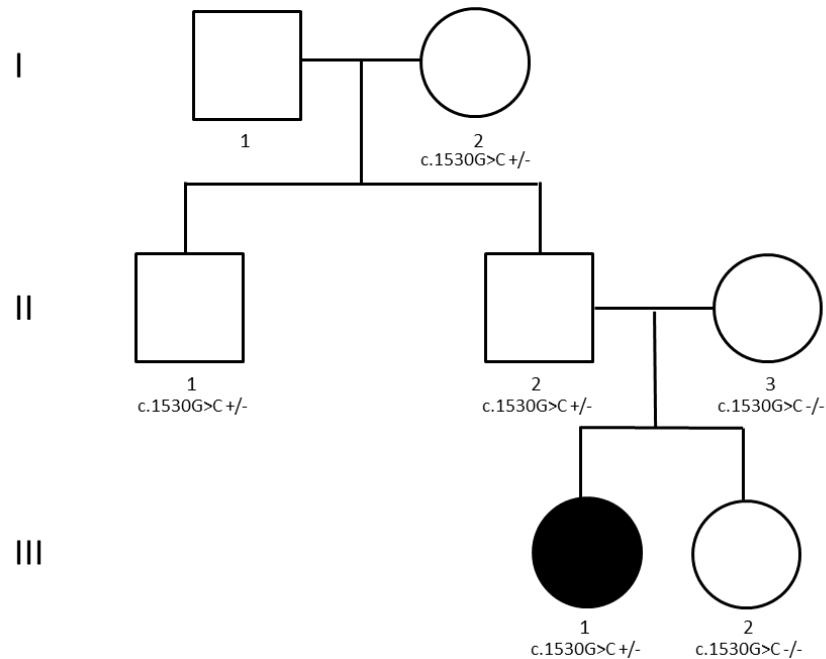
### **c.1768T>G**

Η μετάλλαξη *c.1768T>G* (p.Cys590Gly) στο εξώνιο 14 του γονιδίου *F12* ανιχνεύτηκε σε έναν ασθενή γερμανικής καταγωγής που παρουσιάζει υποτροπιάζον αγγειοίδημα ασαφούς προέλευσης. Η μετάλλαξη αυτή δεν έχει ανιχνευτεί στις 125.748 εξωνικές αλληλουχίες και στα 15.708 γονιδιώματα στη βάση gnomAD (<0,001%). Δεν εντοπίζεται κάποια καταχώρηση της παθογονικότητας της μετάλλαξης στη βάση δεδομένων του ClinVar. Τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και PolyPhen2 χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη ως επιβλαβή και παθογονική, αντίστοιχα. Το GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions 5,4099, το οποίο υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη βρίσκεται σε

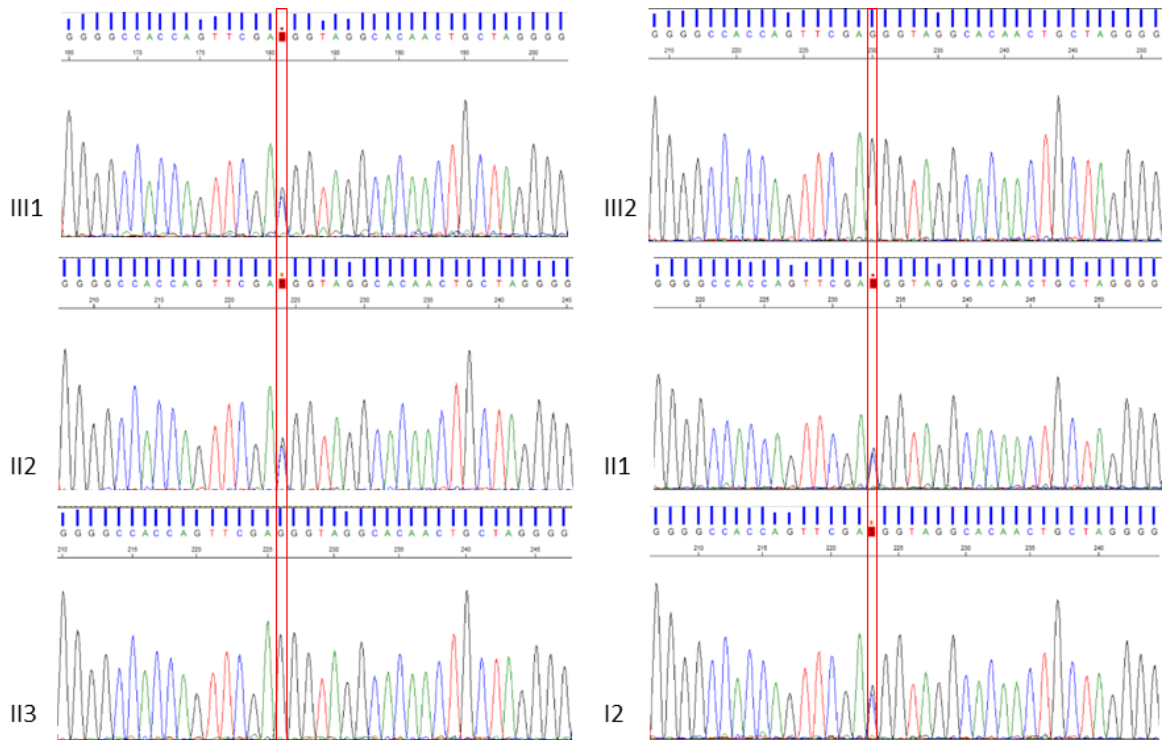
μία συντηρημένη περιοχή.

### c.1530G>C

Η μετάλλαξη c.1530G>C (p.Glu510Asp) ανιχνεύθηκε σε ένα 12-χρονο κορίτσι ελληνικής καταγωγής με κληρονομικό αγγειοσπαστικό που παρουσιάζει πέντε έως έξι κρίσεις αγγειοσπαστικού στο πρόσωπο ανά μήνα. Η ασθενής αυτή έχει φυσιολογικές τιμές C1-INH. Η μετάλλαξη c.1530G>C ανιχνεύτηκε στο εξώνιο 12 του γονιδίου *F12*. Τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και PolyPhen2 χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη ως επιβλαβή και πιθανώς παθογονική, αντίστοιχα. Το GERP έδωσε την τιμή GERP rejected substitutions -1,74, το οποίο υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη βρίσκεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή. Δεν υπάρχει αναφορά αυτής της μετάλλαξης στη βάση δεδομένων ClinVar και δεν έχει ανιχνευτεί στις 125.748 εξωνικές αλληλουχίες και στα 15.708 γονιδιώματα στη βάση gnomAD (<0,001%). Έλαβε χώρα οικογενειακή μελέτη με σκοπό την ανίχνευση της μετάλλαξης c.1530G>C. Εξετάστηκαν πέντε άτομα της οικογένειας (τρεις γυναίκες και δύο άνδρες). Η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε στον πατέρα (II<sub>2</sub>), στο θείο (II<sub>1</sub>) και τη γιαγιά (I<sub>2</sub>) της ασθενούς (III<sub>1</sub>), οι οποίοι δεν είχαν κανένα επεισόδιο αγγειοσπαστικού κατά τη διάρκεια της ζωής τους (**Εικόνα 33** και **Εικόνα 34**).



**Εικόνα 33:** Το γενεαλογικό δέντρο της ελληνικής οικογένειας που φέρει την μετάλλαξη c.1530G>C στο εξώνιο 14 του γονιδίου *F12*. Επεισόδια αγγειοσπαστικού έχει εμφανίσει μόνο ο III<sub>1</sub>.



**Εικόνα 34:** Στην εικόνα απεικονίζεται η μετάλλαξη c.1530G>C στο εξώνιο 14 του γονιδίου *F12* όπως επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger στα έξι μέλη της ελληνικής οικογένειας. Η αρίθμηση των μελών της οικογένειας βασίζεται στο οικογενειακό τους δένδρο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 33**.

Στο γονίδιο *F12* δεν ανιχνεύτηκε κανένας διπλασιασμός ή έλλειψη σε μεγάλες περιοχές του γονιδιώματος βάση της ταυτοποίησης των αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων (CNVs analysis) στα 320 δείγματα που συγκρίθηκαν με ένα πρότυπο δείγμα ελέγχου το οποίο δεν παρουσιάζει CNVs.

## 7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 7.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΝΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *SERPING1*

Ο C1-INH, ο οποίος είναι ένας αναστολέας πρωτεάσης σερίνης, αρχικά αναγνωρίστηκε για τη ρυθμιστική του δραστηριότητα στο σύστημα συμπληρώματος. Ελέγχει την οδό του συμπληρώματος μέσω αναστολής των MASP1, MASP2, C1s, C1r, του συστήματος επαφής αναστέλλοντας τον παράγοντα XII και την καλλικρεΐνη του πλάσματος, την ενδογενή αλληλουχία πήξης μέσω της αναστολής του παράγοντα XI και της θρομβίνης, και το ινωδολυτικό σύστημα μέσω αναστολής του ενεργοποιητή πλασμίνης και πλασμινογόνου [218]. Την δεκαετία του 1960, συσχετίστηκε η ανεπάρκεια του αναστολέα C1 εστεράσης με το κληρονομικό αγγειοοίδημα [219], αλλά μόνο τη δεκαετία του 1980 μελέτες έδειξαν ότι το κληρονομικό αγγειοοίδημα οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1*, το γονίδιο που κωδικοποιεί τον C1-INH [220, 221, 222].

Μέχρι σήμερα, συνολικά έχουν ανιχνευτεί 748 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1*, οι οποίες σχετίζονται με το C1-INH-HAE [40], η πλειονότητα των οποίων εντοπίζονται στις εξωνικές περιοχές του γονιδίου. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις C1-INH-HAE στις οποίες η μετάλλαξη είναι αδύνατο να ανιχνευτεί στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου *SERPING1* [15, 223]. Με την έλευση των νέων τεχνολογιών αλληλούχησης, η ανίχνευση νέων παραλλαγών στο γονίδιο *SERPING1* σε ασθενείς με C1-INH-HAE έχει βελτιωθεί, αποκαλύπτοντας επιπλέον αιτιατές παραλλαγές που δεν ανιχνεύονται με το συμβατικό τρόπο γονοτύπησης [224]. Έτσι, παρατηρείται σημαντική μείωση του ποσοστού των C1-INH-HAE ασθενών με μη αναγνωρισμένη αιτιατή παραλλαγή στο γονίδιο *SERPING1*, που εκτιμάται μεταξύ 3,8% και 17,9% [47, 49, 54, 62, 67, 225, 226, 227].

Επομένως, η ανάπτυξη των νέων τεχνολογιών αλληλούχησης οδήγησε στην ανίχνευση αυξανόμενου αριθμού βαθέων ιντρονικών μεταλλάξεων, δηλαδή μεταλλάξεων που εντοπίζονται τουλάχιστον 100 bp από την πλησιέστερη κανονική τοποθεσία ματίσματος. Η απόδειξη του ρόλου τους, όμως, στα διάφορα γενετικά νοσήματα συνάντησε πληθώρα τεχνικών δυσκολιών. Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν συντηρημένες αλληλουχίες ματίσματος σε συνδέσεις εξωνίων-ιντρονίων αναγνωρίζονται εύκολα ως πιθανώς παθογονικές, ενώ οι παραλλαγές σε ιντρονικές περιοχές είναι δύσκολο να ταξινομηθούν χωρίς λειτουργικές ενδείξεις που παρέχονται από την ανάλυση της μεταγραφής ή την *in vitro* ανάλυση με χρήση της τεχνικής *mini-gene* [228]. Η απλούστερη και η πιο αποτελεσματική μέθοδος για να προσδιοριστεί εάν η επιλεγμένη παραλλαγή επηρεάζει το μάτισμα είναι η ανάλυση του RNA. Η αλληλούχηση του RNA / cDNA μετά την αντίστροφη μεταγραφή PCR (RT-PCR) επιτρέπει την διερεύνηση του ρόλου της μετάλλαξης στην αλληλουχία του mRNA. Το κύριο πρόβλημα με αυτή την προσέγγιση είναι η πιθανότητα της πρόωρης καταστροφής του μεταλλαγμένου μεταγράφου από λειτουργικούς μηχανισμούς του κυττάρου, το οποίο εμποδίζει την περαιτέρω μελέτη της εκάστοτε μετάλλαξης. Σε μια τέτοια κατάσταση, το αποτέλεσμα της πιθανής μετάλλαξης ματίσματος μπορεί εύκολα να παραλειφθεί [69]. Εάν το κατάλληλο υλικό για λειτουργική αλληλούχηση RNA δεν είναι διαθέσιμο, μια εναλλακτική πιθανότητα είναι η τεχνική *mini-gene* - ένα *in vitro* υβριδικό σύστημα που επιτρέπει την «παγίδευση εξωνίων». Αυτό το σύστημα είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την ανάλυση γονιδίων με χαμηλό επίπεδο έκφρασης σε λευκοκύτταρα ή ινοβλάστες [229]. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιώσει εάν η παραλλαγή επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του ματίσματος ή προκαλεί την ενεργοποίηση εναλλακτικών κρυφών θέσεων ματίσματος [230]. Παρόλα αυτά, η τεχνική *mini-gene* είναι μία περίπλοκη

και κοστοβόρα μέθοδος που απαιτεί εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό και δεν μπορεί να εφαρμοστεί από το σύνολο των μοριακών εργαστηρίων [231].

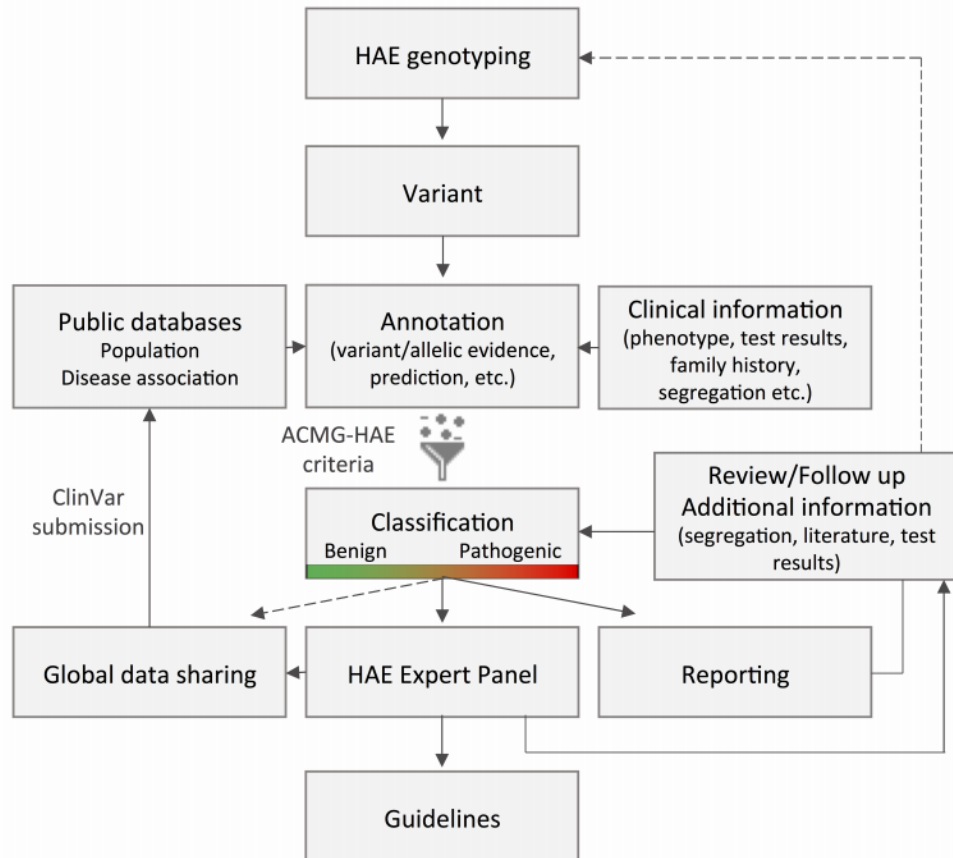
Μία ακόμα σημαντική τροχοπέδη στην αναγνώριση και την ταυτοποίηση της παθογονικότητας των μεταλλάξεων που οδηγούν στην εκδήλωση C1-INH-HAE είναι η έλλειψη της διαθέσιμης πληροφορίας σε μία κοινής αποδοχής βάση δεδομένων. Πρέπει να αναφερθεί ότι μόνο οι μισές παραλλαγές στο γονίδιο *SERPING1* οι οποίες βρέθηκαν στη βιβλιογραφία και σχετίζονται με το HAE έχουν αναφερθεί σε δημόσιες βάσεις δεδομένων, όπως το HAEdb και το ClinVar, με διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων. Η δημόσια βάση ClinVar, η οποία κυκλοφόρησε το 2013, αποτελεί μια πρωτογενή κεντρική βάση δεδομένων που χρηματοδοτήθηκε από το NCBI για την αρχειοθέτηση κλινικά σχετικών παραλλαγών για πολλές ασθένειες, ενώ η βάση HAEdb αποτελεί μια βάση δεδομένων στην οποία καταγράφονται αποκλειστικά μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1*, η οποία όμως εγκαταλείφθηκε τον τελευταίο χρόνο [232]. Παρόλο που το ClinVar περιέχει περίπου τέσσερις φορές λιγότερες αναφορές από το HAEdb, επιτρέπει την εναπόθεση παραλλαγών με κλινικές παρατηρήσεις και ισχυρισμούς και έχει τη δυνατότητα αναθεώρησης της εκτίμησης της παθογονικότητας σε περίπτωση που προκύψουν νέα δεδομένα [233].

Επιπλέον, στις δημόσιες βάσεις δεδομένων έχει παρατηρηθεί η έλλειψη πληροφοριών σχετικά με παραλλαγές γονιδίων που σχετίζονται με το HAE και έχουν αποδειχθεί ως καλοήθεις [234]. Η συμπερίληψη των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στην διαθέσιμη πληροφορία θα μπορούσε να λειτουργήσει σαν μέθοδος αποκλεισμού μεταλλάξεων ως αιτιατές για το συγκεκριμένο νόσημα.

Όπως αναφέρθηκε, την τελευταία δεκαετία, η τεχνολογία αλληλούχησης έχει εξελιχθεί ταχύτατα με την έλευση της αλληλούχησης νέας γενεάς. Υιοθετώντας και αξιοποιώντας την, τα κλινικά εργαστήρια πραγματοποιούν τώρα έναν ολοένα αυξανόμενο κατάλογο γενετικών δοκιμών που εκτείνονται σε γονότυπους, μεμονωμένα γονίδια, panel γονιδίων, αλληλούχηση εξωνικών περιοχών και άλλες γενετικές δοκιμές που παρέχουν ένα τεράστιο όγκο νέων δεδομένων. Λόγω της αυξημένης πολυπλοκότητας, αυτή η εκτεταμένη χρήση γενετικών δοκιμών συνοδεύεται από νέες προκλήσεις στην ερμηνεία των μεταλλάξεων κάτω από κοινά αποδεχτούς κανόνες που θα είναι διαθέσιμοι στο σύνολο της επιστημονικής κοινότητας. Σε αυτό το πλαίσιο το 2015, η ACMG και η AMP κυκλοφόρησαν ένα ευρέως εγκεκριμένο έγγραφο με κατευθυντήριες οδηγίες για την ερμηνεία παραλλαγών [215]. Αυτές οι οδηγίες περιγράφουν τη διαδικασία ταξινόμησης των μεταλλάξεων σε πέντε κατηγορίες - παθογονικές, πιθανώς παθογονικές, VUS, πιθανώς καλοήθεις και καλοήθεις-βάσει κριτηρίων που χρησιμοποιούν πολλαπλούς τύπους αποδεικτικών δεδομένων. Ωστόσο, οι οδηγίες ACMG-AMP δεν λαμβάνουν υπόψη τους συγκεκριμένους γονιδιακούς παράγοντες, όπως τη συχνότητα εμφάνισης και τον επιπολασμό.

Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν οι κατευθυντήριες οδηγίες ACMG-AMP στο κληρονομικό αγγειοίδημα, αναπτύχθηκε μια συγκεκριμένη προσαρμογή των κριτηρίων με στόχο τη βελτίωση τους για την ερμηνεία των παραλλαγών κυρίως για το γονίδιο *SERPING1* [37]. Κάθε παραλλαγή που ανιχνεύεται στο γονίδιο *SERPING1* πρέπει να αξιολογηθεί σε σχέση με την παρουσία της σε δημόσιες βάσεις δεδομένων, πληθυσμιακά δεδομένα, *in silico* ανάλυση, *in vivo* και *in vitro* αποτελέσματα δοκιμών και αποτελέσματα οικογενειακών μελετών. Τα προαναφερθέντα διαθέσιμα αποδεικτικά στοιχεία πρέπει να σταθμίζονται και να εφαρμόζονται στα κριτήρια ACMG/AMP [37]. Στη συνέχεια, η παραλλαγή και τα αποδεικτικά στοιχεία πρέπει να υποβληθούν στο ClinVar. Οι νέες παραλλαγές που κατατίθενται στο ClinVar θα ελέγχονται από μία ομάδα εμπειρογνομόνων εξειδικευμένους για το HAE, η οποία αποφασίστηκε να συσταθεί από την ClinGen με σκοπό την αξιολόγηση της παθογένειας των γενετικών παραλλαγών που υποβάλλονται στο ClinVar, το

σχεδιασμό και την επικύρωση κανόνων για την ταξινόμηση των παραλλαγών [235]. Όταν νέα στοιχεία αλλάζουν την αρχική εκτίμηση της μετάλλαξης, η ταξινόμηση πρέπει να επαναλαμβάνεται και τα ενημερωμένα αποτελέσματα πρέπει να κοινοποιούνται σε όλα τα εμπλεκόμενα μέρη (Εικόνα 35).



**Εικόνα 35:** Ροή εργασιών για την αξιολόγηση των ανιχνευμένων μεταλλάξεων που δυνητικά θα μπορούσαν να οδηγούν στην εκδήλωση του κληρονομικού αγγειοιδήματος [37].

Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί 52 ιντρονικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1* σε ασθενείς με C1-INH-HAE, οι πλειονότητα των οποίων εντοπίζονται όμως στην 5' και 3' θέσεις ματίσματος ή μερικά νουκλεοτίδια από αυτές τις περιοχές. Μόλις τον τελευταίο χρόνο καταγράφηκε η πρώτη βαθιά ιντρονική μετάλλαξη, c.1029+384A>G, της οποίας η σχέση με το C1-INH-HAE έχει αποδειχθεί μετά την διεκπεραίωση λειτουργικών μελετών στο επίπεδο του RNA [76].

Με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων στις μη κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου *SERPING1* σε ασθενείς με C1-INH-HAE, αλληλουχήθηκε το μεγαλύτερο μέρος του γονιδίου σε 15 ασθενείς με C1-INH-HAE χωρίς μεταλλάξεις στο γονίδιο *SERPING1* μετά από συμβατική μοριακή ανάλυση. Η αλληλούχηση νέας γενεάς επιβεβαίωσε την απουσία εξωνικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1* με εξαίρεση τους δύο γνωστούς πολυμορφισμούς, τον rs4926 στο εξώνιο 8 και τον rs28362944 στο εξώνιο 2. Επιπλέον, ανιχνεύτηκαν 37 διαφορετικές ιντρονικές μεταλλάξεις σε αυτούς τους ασθενείς, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν βάση των κατευθυντήριων οδηγιών ACMG/AMP.

Ο Πίνακας 15 παρουσιάζει την εκτίμηση της παθογονικότητας τους και τα κριτήρια ACMG-AMP για τον χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων.

**Πίνακας 15:** Η εκτίμηση της παθογονικότητας των ανιχνευμένων ιντρονικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *SERPING1* με βάση τα κριτήρια ACMG-AMP για τον χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων και η καταχώρηση του στη βάση ClinVar.

Μετάλλαξη	ClinVar	Κριτήρια	Χαρακτηρισμός
c.-22-155G>T	870444	PS3, PM2, PP1, PP2, PP3, PP4	Παθογονική
c.51+101G>A	983229	BA1	Καλοήθης
c.51+625_51+626dupTG	983237	BA1	Καλοήθης
c.52-696C>T	983238	BA1	Καλοήθης
c.52-130C>T	983239	BA1	Καλοήθης
c.551-500C>G	983240	BA1	Καλοήθης
c.551-495A>C	983241	BA1	Καλοήθης
c.551-156A>G	983242	BS2, BS4, BP4, BP5	Καλοήθης
c.551-155A>G	983243	BA1	Καλοήθης
c.685+88G>A	92196	BA1	Καλοήθης
c.685+1100C>T	983245	BA1	Καλοήθης
c.686-1572G>T	983246	BA1	Καλοήθης
c.686-1565G>A	983247	BA1	Καλοήθης
c.686-1488_686-1487insT	983248	BS4, BP4, BP5	Πιθανώς Καλοήθης
c.686-1335T>A	983249	BS4, BP4, BP5	Πιθανώς Καλοήθης
c.686-1333A>T	983250	BS2, BP4, BP5	Πιθανώς Καλοήθης
c.686-957A>G	983251	BA1	Καλοήθης
c.686-179A>G	983252	BS1, BP4	Πιθανώς Καλοήθης
c.890-14C>G	1064580	PM2, PP1, PP2, PP3, PP4	Πιθανώς Παθογονική
c.1029+260G>A	983253	BS1, BS2, BS4, BP4,	Καλοήθης
c.1029+312T>C	983254	BA1	Καλοήθης
c.1029+851C>G	983255	BA1	Καλοήθης
c.1029+926G>T	983256	BA1	Καλοήθης
c.1029+1443G>C	983257	BA1	Καλοήθης
c.1029+1497A>G	983258	BS1, BS4, BP4, BP5	Καλοήθης
c.1029+2110T>C	983259	BA1	Καλοήθης
c.1029+2111G>A	983260	BA1	Καλοήθης
c.1030-1975G>C	983230	BS1, BS4, BP4, BP5	Καλοήθης
c.1030-1513delT	983231	BS1, BS4, BP4	Καλοήθης
c.1030-1222A>G	983232	BA1	Καλοήθης
c.1030-1198G>T	983233	BA1	Καλοήθης
c.1030-865C>T	983234	BA1	Καλοήθης
c.1030-20A>G	254785	BA1	Καλοήθης
c.1250-538T>C	983235	BA1	Καλοήθης
c.1250-282T>C	983236	BA1	Καλοήθης
c.1250-154C>G	983244	BS2, BS4, BP4	Καλοήθης
c.1029+384A>G	870445	PS4, PM2, PP1, PP2, PP3, PP4, PP5	Παθογονική

Οι 24 από τις ανιχνευμένες μεταλλάξεις έχουν συχνότητα αλληλομόρφου μεγαλύτερη από 10%, το οποίο τις κατατάσσει αυτόματα ως καλοήθεις βάση του ACMG-AMP κριτηρίου BA1, το οποίο αναφέρει ότι αν η συχνότητα αλληλομόρφων είναι μεγαλύτερη από 5% σε βάσεις δεδομένων πληθυσμού όπως στο Exome Sequencing Project, στο 1000 Genomes Project, ή στο Exome Aggregation Consortium κατατάσσεται ως καλοήθης μετάλλαξη, χωρίς την ανάγκη να υπάρχει άλλο κριτήριο που να υποστηρίζει την καλοήθεια [215].

#### **c.686-179A>G**

Η μετάλλαξη c.686-179A>G (rs189335964) η οποία εντοπίστηκε στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1* χαρακτηρίζεται ως πιθανώς καλοήθης βάση των ACMG-AMP κριτηρίων, καθώς η συχνότητα αλληλομόρφων στην βάση δεδομένων πληθυσμού gnomAD (0,18% για τον ευρωπαϊκό πληθυσμό και 0,1% για τον παγκόσμιο πληθυσμό) είναι μεγαλύτερη από το αναμενόμενο για το κληρονομικό αγγειοίδημα (0,002%) (BS1) [215]. Επίσης, το σύνολο των βιοπληροφορικών

εργαλείων στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη την χαρακτηρίζουν ως καλοήθη (BP4). Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP επισήμανε ότι η μετάλλαξη εντοπίζεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου.

#### **c.1029+260G>A**

Η μετάλλαξη c.1029+260G>A (rs191053716) στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1* ανιχνεύεται σε συχνότητα 0,12% στον παγκόσμιο πληθυσμό και 0,24% στον ευρωπαϊκό πληθυσμό, δηλαδή σε συχνότητα αρκετά μεγαλύτερη από το αναμενόμενο για το νόσημα (BS1). Ανιχνεύτηκε σε ένα υγιές ενήλικο άτομο από την ομάδα ελέγχου (BS2), αλλά δεν παρατηρήθηκε στα τρία ασθενή μέλη της οικογένειας του πρωταρχικού ασθενή (BS4). Τα εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη για την εκτίμηση της πιθανής παθογονικότητας της δείχνουν ότι δεν επηρεάζει το γονίδιο ή το γονιδιακό προϊόν (BP4). Η μετάλλαξη εντοπίζεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου GERP. Το βιοπληροφορικό εργαλείο Human Splicing Finder επισήμανε ότι η μετάλλαξη προκαλεί τροποποίηση μίας θέσης ESS, χωρίς όμως να επηρεάζει την διαδικασία του ματίσματος. Συνοψίζοντας, βάση των ACMG-AMP κριτηρίων η μετάλλαξη c.1029+260G>A χαρακτηρίζεται ως καλοήθης [215].

#### **c.1029+1497A>G**

Η μετάλλαξη c.1029+1497A>G (rs17661117), η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* χαρακτηρίζεται ως καλοήθης βάση των ACMG-AMP κριτηρίων [215]. Ανιχνεύτηκε σε μία 53-χρονη ασθενή με C1-INH-HAE, ωστόσο δεν ανιχνεύτηκε στα τρία ασθενή μέλη της οικογένειας της (BS4). Η συχνότητα της μετάλλαξης στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 0,70% και στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 0,65% βάση της gnomAD database, δηλαδή σε συχνότητα αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με το κληρονομικό αγγειοίδημα (0,002%) (BS1). Τα οχτώ βιοπληροφορικά εργαλεία στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη για την εκτίμηση της πιθανής παθογονικότητας της χαρακτήρισαν την μετάλλαξη ως καλοήθη (BP4). Η μετάλλαξη c.1029+1497A>G εντοπίζεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου GERP. Το εργαλείο Human Splicing Finder επισήμανε ότι η μετάλλαξη προκαλεί την ενεργοποίηση μίας κρυφής 5' θέσης ματίσματος, το οποίο όμως δεν επιβεβαιώθηκε από τα υπόλοιπα βιοπληροφορικά εργαλεία. Επιπλέον, η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς με U-HAE από την ομάδα ελέγχου, δηλαδή σε ασθενείς με εναλλακτική μοριακή βάση για την ασθένεια (BP5).

#### **c.1030-1975G>C**

Η μετάλλαξη c.1030-1975G>C (rs151035150), η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING*, ανιχνεύεται σε συχνότητα 1,13% στον παγκόσμιο πληθυσμό και 1,63% στον ευρωπαϊκό πληθυσμό, δηλαδή σε συχνότητα αρκετά μεγαλύτερη από το αναμενόμενο για το C1-INH-HAE (BS1). Η παρουσία της μετάλλαξης c.1030-1975G>C διερευνήθηκε σε μία εκ των δύο οικογενειών και ανιχνεύτηκε μόνο σε ένα από τα τέσσερα ασθενή μέλη (BS4). Τα εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη c.1030-1975G>C για την εκτίμηση της πιθανής παθογονικότητας της δείχνουν ότι δεν επηρεάζει το γονίδιο ή το γονιδιακό προϊόν (BP4). Το εργαλείο GERP επισήμανε ότι η μετάλλαξη εντοπίζεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου. Το Human Splicing Finder επισήμανε ότι η μετάλλαξη προκαλεί τροποποίηση μίας θέσης ESS, χωρίς όμως να επηρεάζει την διαδικασία του ματίσματος. Τέλος, ανιχνεύτηκε σε τέσσερις ασθενείς με U-HAE από την ομάδα ελέγχου (BP5). Συνοψίζοντας, βάση των ACMG-AMP κριτηρίων η μετάλλαξη c.1030-1975G>C χαρακτηρίζεται ως καλοήθης [215].



### **c.1030-1513delT**

Η μετάλλαξη c.1030-1513delT (rs1184255008) στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* χαρακτηρίζεται ως καλοήθης βάση των ACMG-AMP κριτηρίων, καθώς η συχνότητα αλληλομόρφων στην βάση δεδομένων πληθυσμού gnomAD (0,003% για τον ευρωπαϊκό πληθυσμό και 0,006% για τον παγκόσμιο πληθυσμό) είναι μεγαλύτερη από το αναμενόμενο για το κληρονομικό αγγειοόδημα (0,002%) (BS1) [215]. Η παρουσία της μετάλλαξης c.1030-1513delT διερευνήθηκε σε ένα ασθενές μέλος της οικογένειας της αρχικής ασθενούς, ωστόσο δεν ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη σε αυτό το άτομο (BS4). Τα τρία από τα εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία ήταν αδύνατο να χρησιμοποιηθούν καθώς δεν υποστηρίζουν την εκτίμηση ελλείψεων (CADD, Trap, DANN). Τα πέντε από τα εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη για την εκτίμηση της πιθανής παθογονικότητας της δείχνουν ότι δεν επηρεάζεται το γονίδιο ή το γονιδιακό προϊόν (BP4). Το εργαλείο GERP επισήμανε ότι η μετάλλαξη c.1030-1513delT εντοπίζεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου. Το βιοπληροφορικό εργαλείο Human Splicing Finder επισήμανε ότι η μετάλλαξη θα μπορούσε να προκαλεί την ενεργοποίηση μίας κρυφής 5' θέσης ματίσματος ή εναλλακτικά προκαλεί τροποποίηση μίας θέσης ESS, το οποίο όμως δεν επιβεβαιώθηκε από τα υπόλοιπα βιοπληροφορικά εργαλεία.

### **c.551-156A>G**

Η μετάλλαξη c.551-156A>G, η οποία ανιχνεύεται στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου *SERPING1*, χαρακτηρίζεται ως καλοήθης βάση των ACMG-AMP κριτηρίων [215]. Εντοπίστηκε σε μία ασθενή με C1-INH-HAE, αλλά δεν παρατηρήθηκε στα τρία ασθενή μέλη της οικογένειας της (BS4). Με την χρήση της ομάδας ελέγχου επιτεύχθηκε η ανίχνευση της μετάλλαξης σε ένα υγιές ενήλικο άτομο (BS2) και σε ασθενείς με εναλλακτική μοριακή βάση για την ασθένεια (BP5). Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP δεν μπόρεσε να δώσει αποτέλεσμα για την συγκεκριμένη περιοχή στην οποία εντοπίζεται η μετάλλαξη. Τα υπόλοιπα βιοπληροφορικά εργαλεία στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη για την εκτίμηση της πιθανής παθογονικότητας της δείχνουν ότι δεν επηρεάζεται το γονίδιο ή το γονιδιακό προϊόν (BP4). Το βιοπληροφορικό εργαλείο Human Splicing Finder επισήμανε ότι η μετάλλαξη θα μπορούσε να προκαλεί την δημιουργία μίας θέσης ESE, το οποίο όμως δεν επιβεβαιώθηκε από τα υπόλοιπα βιοπληροφορικά εργαλεία.

### **c.686-1488\_686-1487insT**

Η μετάλλαξη c.686-1488\_686-1487insT στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1*, ανιχνεύτηκε σε μία 63-χρονη ασθενή με C1-INH-HAE, αλλά δεν ανιχνεύτηκε στα τέσσερα ασθενή μέλη της οικογένειας της (BS4). Επιπλέον, ανιχνεύτηκε σε έναν U-HAE ασθενή από την ομάδα ελέγχου, δηλαδή σε ασθενή με εναλλακτική μοριακή βάση για την ασθένεια (BP5). Τα τρία από τα εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία ήταν αδύνατο να χρησιμοποιηθούν καθώς δεν υποστηρίζουν την εκτίμηση των ελλείψεων (CADD, Trap, DANN). Το σύνολο των υπολοίπων βιοπληροφορικών εργαλείων στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη για την εκτίμηση της πιθανής παθογονικότητας της δείχνουν ότι δεν επηρεάζεται το γονίδιο ή το γονιδιακό προϊόν (BP4). Το Human Splicing Finder επισήμανε ότι η μετάλλαξη θα μπορούσε να προκαλεί την δημιουργία μίας θέσης ESE, το οποίο όμως δεν επιβεβαιώθηκε από τα υπόλοιπα βιοπληροφορικά εργαλεία. Το εργαλείο GERP επισήμανε ότι η μετάλλαξη εντοπίζεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου. Συνοψίζοντας, βάση των ACMG-AMP κριτηρίων η μετάλλαξη c.686-1488\_686-1487insT χαρακτηρίζεται ως πιθανώς καλοήθης [215].

### **c.686-1335T>A**

Η μετάλλαξη c.686-1335T>A (rs1156278971) στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1*, η οποία ανιχνεύτηκε σε μία ασθενή με C1-INH-HAE, εντοπίστηκε μόνο στα δύο από τα τέσσερα συγγενικά ασθενή μέλη της οικογένειας του αρχικού ασθενούς (BS4). Επιπρόσθετα, η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε τρεις ασθενείς με nC1-INH-HAE από την ομάδα ελέγχου, δηλαδή σε ασθενείς με εναλλακτική μοριακή βάση για την ασθένεια (BP5). Τα εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη c.686-1335T>A για την εκτίμηση της πιθανής παθογονικότητας της δείχνουν ότι δεν επηρεάζει το γονίδιο ή το γονιδιακό προϊόν (BP4). Το βιοπληροφορικό εργαλείο Human Splicing Finder επισήμανε ότι η μετάλλαξη προκαλεί τροποποίηση μίας θέσης ESS ή εναλλακτικά τη δημιουργία μίας θέσης ESE, χωρίς όμως να επηρεάζει την διαδικασία του ματίσματος. Το GERP επισήμανε ότι η c.686-1335T>A εντοπίζεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου. Συνοψίζοντας, βάση των ACMG-AMP κριτηρίων η μετάλλαξη c.686-1335T>A χαρακτηρίζεται ως πιθανώς καλοήθης [215].

#### **c.686-1333A>T**

Η μετάλλαξη c.686-1333A>T, η οποία εντοπίστηκε στο ιντρόνιο 4 του γονιδίου *SERPING1*, χαρακτηρίζεται ως πιθανώς καλοήθης βάση των ACMG-AMP κριτηρίων [215]. Με την χρήση της ομάδας ελέγχου επιτεύχθηκε η ανίχνευση της μετάλλαξης σε έξι υγιή ενήλικα άτομα (BS2) και σε 28 ασθενείς με εναλλακτική μοριακή βάση για την ασθένεια (BP5). Τα εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη c.686-1333A>T για την εκτίμηση της πιθανής παθογονικότητας της δείχνουν ότι δεν επηρεάζει το γονίδιο ή το γονιδιακό προϊόν (BP4). Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP επισήμανε ότι η μετάλλαξη εντοπίζεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου.

#### **c.1250-154C>G**

Η μετάλλαξη c.1250-154C>G (rs879810971), η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 7 του γονιδίου *SERPING1*, ανιχνεύτηκε σε έναν 45-χρονο ασθενή ελληνικής καταγωγής με C1-INH-HAE και σε δύο από τα έξι μέλη της οικογένειας του, έναν υγιή και έναν ασθενή με C1-INH-HAE (BS2, BS4). Τα εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία στα οποία υποβλήθηκε η μετάλλαξη c.1250-154C>G για την εκτίμηση της παθογονικότητας της χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη ως καλοήθη (BP4). Το εργαλείο GERP επισήμανε ότι η μετάλλαξη εντοπίζεται σε μία μη συντηρημένη περιοχή του γονιδίου. Συνοψίζοντας, βάση των ACMG-AMP κριτηρίων η μετάλλαξη c.1250-154C>G χαρακτηρίζεται ως καλοήθης [215].

#### **c.-22-155G>T**

Η μετάλλαξη c.-22-155G>T, η οποία εντοπίζεται στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *SERPING1*, ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς με C1-INH-HAE και σε όλα τα ασθενή μέλη από τη μία οικογένεια που εξετάστηκε, ενώ δεν ανιχνεύτηκε στα υγιή μέλη της οικογένειας.

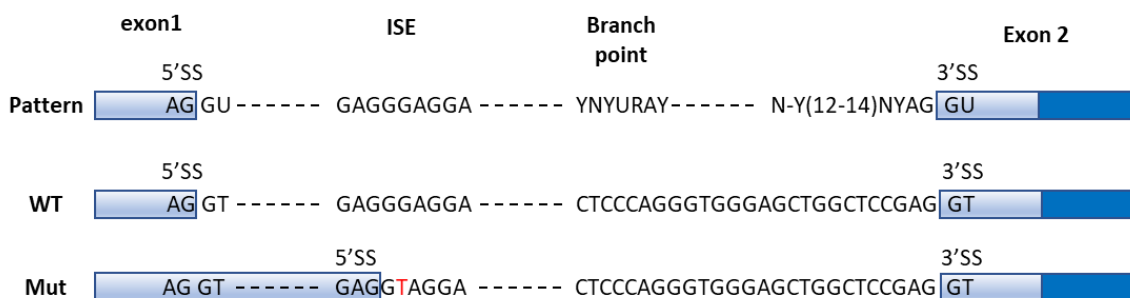
Στην πλειονότητα τους οι παθογονικές βαθιές ιντρονικές μεταλλάξεις οδηγούν στην δημιουργία ψευδο-εξωνίων λόγω ενεργοποίησης μη κανονικών θέσεων ματίσματος. Εναλλακτικά προκαλούν αλλαγές σε ρυθμιστικά στοιχεία της μεταγραφής ή τροποποιούν τα ρυθμιστικά μοτίβα μεταγραφής και τα γονίδια RNA που δεν κωδικοποιούνται.

Η ανάλυση της μετάλλαξης με τα βιοπληροφορικά εργαλεία έδειξε ότι επηρεάζει το μάτισμα και μεταβάλλει το μεταγραφόμενο mRNA. Αναλυτικότερα, με τη χρήση των βιοπληροφορικών εργαλείων NNSPLICE, NetGene2 και FSPLICE και ASSP έχει αποδειχθεί ότι η μετάλλαξη c.-22-155G>T εισάγει στο γονιδίωμα μια νέα 5' θέση ματίσματος ισχυρότερη από την φυσιολογική το οποίο οδηγεί σε ένα μεγαλύτερο εξώνιο 1 στο επίπεδο του mRNA. Αυτό επιβεβαιώθηκε από το

εργαλείο HSF δείχνοντας, παράλληλα, ότι η παραλλαγή διαταράσσει ένα ISE που αναγνωρίζεται από συγκεκριμένους ρυθμιστικούς παράγοντες. Σύμφωνα με το βιοπληροφορικό εργαλείο ASSP η νέα 5' θέση ματίσματος δρα σε συνδυασμό με την προϋπάρχουσα κανονική 3' θέση ματίσματος, καθώς δεν αναγνωρίζεται άλλη πιο ισχυρή μη-κανονική 3' θέση ματίσματος που δυνητικά θα μπορούσε να ενεργοποιηθεί από την μετάλλαξη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την προσθήκη στο ώριμο mRNA 370 bp, οι οποίες προέρχονται από το ιντρόνιο 1 (**Εικόνα 36**). Η αλληλουχία που προστίθεται διαθέτει δύο νέα κωδικόνια ATG, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν κωδικόνιο έναρξης κατά τη μετάφραση. Σύμφωνα με το μοντέλο σάρωσης, η ριβοσωμική υπομονάδα 40S σαρώνει το mRNA σε κατεύθυνση 5' με 3' και μπορεί να ξεκινήσει τη μετάφραση στο πρώτο AUG που συναντά **[236]**. Το πρώτο ATG διαθέτει το κατάλληλο μοτίβο για να λειτουργήσει ως κωδικόνιο έναρξης (AnnAUGn) **[237]**. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και την δημιουργία πρόωρου κωδικονίου τερματισμού, 330 νουκλεοτίδια μετά το νέο κωδικόνιο έναρξης. Στο επίπεδο του RNA, τα PTC μπορούν να παραχθούν λόγω του εναλλακτικού ματίσματος ή, λιγότερο συχνά, από σφάλματα μεταγραφής. Εκτιμάται ότι, στα θηλαστικά, περίπου το ένα τρίτο των εναλλακτικών συναρμολογημένων μεταγράφων περιέχει PTC και αποτελεί υπόστρωμα για τους ελεγκτικούς μηχανισμούς του κυττάρου **[238]**. Το μεταλλαγμένο mRNA είναι ευαίσθητο στην αποικοδόμηση από τις ρυθμιστικές οδούς παρακολούθησης του κυττάρου. Κατά συνέπεια, μόνο το αλλήλιο άγριου τύπου μεταφράζεται και αυτό έχει ως αποτέλεσμα ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C1-INH.

Επιπλέον, με την ανάλυση τόσο της φυσιολογικής αλληλουχίας όσο και της μεταλλαγμένης, το SpliceAid 2 κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η διαφορετική σύνθεση καταστρέφει μοτίβα που αναγνωρίζονται από ρυθμιστικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των μοτίβων ματίσματος για τους μεταγραφικούς παράγοντες hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F, hnRNP H3 που ενεργούν ως καταστολείς στην φυσιολογική αλληλουχία. Οι ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (hnRNP), συνδέονται με εξωνικές και ιντρονικές θέσεις και προκαλούν σίγαση του ματίσματος **[239]**. Η οικογένεια πρωτεϊνών hnRNP περιλαμβάνει διαφορετικές πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μεταξύ 34 και 120 kDa, που ονομάζονται αλφαβητικά από hnRNP A έως hnRNP U **[240]**. Η ρυθμιστική τους δράση μπορεί να περιλαμβάνει τη δέσμευση των πρωτεϊνών hnRNP στα δύο άκρα του εξωνίου, και λόγω της αλληλεπίδρασής τους, μπλοκάρεται το σύμπλεγμα του σωμάτιου συναρμογής. Ένας άλλος προτεινόμενος μηχανισμός υποδηλώνει ότι οι hnRNPs καλύπτουν το εξώνιο και ενεργούν ως ανταγωνιστές των ενισχυτών ματίσματος αποτρέποντας τη δέσμευσή τους **[241, 242, 243]**. Οι μεταγραφικοί παράγοντες hnRNP H και F ελέγχουν τις διαδικασίες εναλλακτικού ματίσματος δεσμευόμενοι σε οδούς G που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από τις 5' και 3' θέσεις ματίσματος **[244, 245, 246, 247, 248]**. Οι hnRNP H και F μπορούν είτε να ενισχύσουν είτε να αναστέλλουν το εναλλακτικά ματισμένο εξώνιο και το μέγεθος του φαινομένου εξαρτάται από το μήκος των οδών G, την ιντρονική έναντι της εξωνικής θέσης και την ισχύ των 5' θέσεων ματίσματος **[249, 250, 251, 252, 253]**.

Η περιοχή στην οποία εντοπίζεται η μετάλλαξη c.-22-155G>T αποτελεί μία όχι ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου GERP. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα πρώτα ιντρόνια των εκάστοτε γονιδίων είναι συνήθως τα μεγαλύτερα σε μέγεθος και τα πιο συντηρημένα **[254]**. Η διατήρηση του πρώτου ιντρονίου σχετίζεται πιθανώς με την παρουσία ρυθμιστικών στοιχείων **[255]** και ένα συγκεκριμένο πρότυπο οργάνωσης χρωματίνης **[256]**. Ωστόσο, το πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου *SERPING1* δεν είναι το μακρύτερο σε σχέση με τα υπόλοιπα ιντρόνια εντός του γονιδίου όπως συμβαίνει στα περισσότερα είδη **[257]**.



**Εικόνα 36:** Γραφική παρουσίαση της επίδρασης της παραλλαγής c.-22-155G>T σύμφωνα με τη βιοπληροφορική ανάλυση. Η παραλλαγή προβλέπεται ότι σχηματίζει μία εναλλακτική 5' θέση ματίσματος που οδηγεί σε ένα τροποποιημένο μεταλλαγμένο RNA μεγαλύτερο (370 bp) από το φυσιολογικό.

Με σκοπό την επιβεβαίωση των δεδομένων που παρήχθησαν από τα βιοπληροφορικά εργαλεία, έλαβε χώρα λειτουργική μελέτη στο επίπεδο του mRNA. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ένα εξωνικό SNP, δηλαδή ο πολυμορφισμός rs4926 (c.1438G>A), που στο επίπεδο του DNA στους ασθενείς ήταν σε ετερόζυγη κατάσταση. Σε επίπεδο RNA, αυτός ο πολυμορφισμός βρέθηκε σε ομόζυγη κατάσταση, πράγμα που δείχνει ότι το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο είναι υποβαθμισμένο, προφανώς μέσω μονοπατιών παρακολούθησης mRNA. Αυτό πιθανότατα σχετίζεται με τους ευκαρυωτικούς μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου που αναγνωρίζουν και εξαλείφουν παρεκκλίνουσες μορφές mRNA κατά τη διαδικασία της μετάφρασης [258], η διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση, η αποικοδόμηση μη-τερματισμού ή η no-go αποικοδόμηση. Τα μονοπάτια NMD και NSD προκύπτουν από την παρουσία ενός πρόωρου κωδικονίου τερματισμού ή από την έλλειψη κωδικονίου τερματισμού, αντίστοιχα. Ο τρίτος μηχανισμός, NGD, συνδέεται με δευτερεύοντα χαρακτηριστικά δομής. Δεδομένου ότι από τη βιοπληροφορική ανάλυση προέκυψε ότι δημιουργείται ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού, ο εποπτικός μηχανισμός του κυττάρου που χρησιμοποιείται στην περίπτωση της c.-22-155G>T είναι πιθανότατα ο NMD.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε έναν ασθενή με φαινότυπο ιδιαίτερα συγκεκριμένο για το C1-INH-HAE με μία γενετική αιτιολογία (PP4). Εντοπίστηκε στο σύνολο των ασθενών-μελών της οικογένειας που εξετάστηκαν σε ένα γονίδιο που είναι γνωστό ότι προκαλεί το συγκεκριμένο νόσημα (PP1). Όπως αποδείχθηκε, η μετάλλαξη οδηγεί σε αποικοδόμηση του παραγόμενου mRNA από ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυττάρου και το σύνολο των ασθενών που είναι φορείς της συγκεκριμένης μετάλλαξης έχουν μειωμένη πρωτεΐνη C1-INH, επομένως η βλαβερή επίδραση της μετάλλαξης έχει αποδειχθεί βάση *in vitro* λειτουργικών μελετών (PS3). Η μετάλλαξη c.-22-155G>T χαρακτηρίζεται ως παθογονική από το σύνολο των βιοπληροφορικών εργαλείων (PP3). Ανιχνεύεται σε ένα γονίδιο που έχει χαμηλό ποσοστό μη παθογόνων παραλλαγών και στο οποίο οι μεταλλάξεις είναι ένας κοινός μηχανισμός ασθένειας (PP2). Η μετάλλαξη απουσιάζει από την πληθυσμιακή βάση δεδομένων gnomAD (PM2). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες ACMG-AMP η μετάλλαξη c.-22-155G>T χαρακτηρίζεται ως παθογονική [215].

#### c.1029+384A>G

Η μετάλλαξη c.1029+384A>G η οποία ανιχνεύεται στο ιντρόνιο 6 του γονιδίου *SERPING1* χαρακτηρίζεται βάση των κατευθυντήριων οδηγιών ACMG-AMP ως παθογονική [215]. Οι Hujoná et al ανίχνευσαν την μετάλλαξη σε μία οικογένεια τσέχικης καταγωγής, η οποία αποτελούνταν από δώδεκα ασθενείς με C1-INH-HAE [76]. Όπως αποδείχθηκε βάση λειτουργικών μελετών η μετάλλαξη c.1029+384A>G οδηγεί στην εισαγωγή ενός ψευδο-εξωνίου 89 bp στο παραγόμενο mRNA

[76]. Το ψευδο-εξώνιο οδηγεί σε μεταγενέστερο πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού και πιθανή αποικοδόμηση μέσω ρυθμιστικών μηχανισμών του κυττάρου. Αυτό εξηγεί το χαμηλό επίπεδο του αναστολέα C1-INH.

Στην πληθυσμιακή ομάδα που εξετάσαμε η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε τρία ασθενή μέλη μίας οικογένειας, ενώ δεν ανιχνεύτηκε στα τρία υγιή μέλη της. Τα βιοπληροφορικά εργαλεία παρουσίασαν αντικρουόμενα αποτελέσματα καθώς τα εργαλεία NNSPLICE, NetGene 2, ASSP, FSPLICE και HSF προέβλεψαν ότι η μετάλλαξη c.1029+384A>G ενεργοποιεί μία 5' θέση ματίσματος, το εργαλείο CADD χαρακτήρισε τη μετάλλαξη ως καλοήγη, ενώ τα εργαλεία Trap και DANN χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη ως ουδέτερη. Η θέση που εντοπίζεται η μετάλλαξη δεν είναι συντηρημένη βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου GERP.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η μετάλλαξη εντοπίστηκε στο σύνολο των ασθενών-μελών της οικογένειας που εξετάστηκε σε ένα γονίδιο που είναι γνωστό ότι προκαλεί το συγκεκριμένο νόσημα, ενώ απουσιάζει από τα υγιή μέλη της οικογένειας (PP1). Ο φαινότυπος των ασθενών ήταν ιδιαίτερα συγκεκριμένος όσον αφορά το κληρονομικό αγγειοίδημα (PP4), ενώ η μετάλλαξη ανιχνεύεται στο γονίδιο *SERPING1* το οποίο παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό μη παθογόνων παραλλαγών και στο οποίο οι μεταλλάξεις είναι ένας κοινός μηχανισμός που οδηγεί στην εμφάνιση αγγειοιδήματος (PP2). Η μετάλλαξη c.1029+384A>G χαρακτηρίζεται ως παθογονική από πέντε βιοπληροφορικά εργαλεία (PP3). Η συχνότητα της μετάλλαξης είναι μικρότερη από 0,001%, καθώς δεν έχει ανιχνευτεί στις 125.748 εξωνικές αλληλουχίες και στα 15.708 γονιδιώματα στη βάση δεδομένων gnomAD (PM2) και ο επιπολασμός της μετάλλαξης στους ασθενείς είναι αυξημένος σε σύγκριση με τον επιπολασμό στην ομάδα ελέγχου (PS4). Οι Hujoná et al [76] ανέφεραν πρόσφατα την παραλλαγή ως παθογονική (PP5). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες ACMG-AMP η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως παθογονική [215].

#### **c.890-14C>G**

Η μετάλλαξη c.890-14C>G στο ιντρόνιο 5 του γονιδίου *SERPING1* ανιχνεύτηκε σε πέντε ασθενείς με C1-INH-HAE μέλη μίας οικογένειας, αλλά δεν ανιχνεύτηκε στους υγιείς συγγενείς τους.

Η πρόβλεψη των βιοπληροφορικών εργαλείων δεν παρουσιάζει ομοιογένεια στο σύνολο της, καθώς τα εργαλεία HSF και NetGene 2 υποστήριξαν ότι η μετάλλαξη c.890-14C>G οδηγεί στη δημιουργία μίας νέας 3' θέσης ματίσματος, ενώ τα εργαλεία NNSPLICE, ASSP, FSPLICE, CADD, και Trap χαρακτηρίζει τη μετάλλαξη ως καλοήγη (Εικόνα 37). Το βιοπληροφορικό εργαλείο NetGene 2 επισημαίνει ότι η νέα μεταλλαγμένη 3' θέση ματίσματος είναι λιγότερο ισχυρή από την φυσιολογική, ενώ το βιοπληροφορικό εργαλείο HSF προβλέπει ότι η μετάλλαξη εντοπίζεται στη θέση διακλάδωσης του ιντρονίου 5, που αποτελεί μία από τις ρυθμιστικές θέσεις της μεταγραφής.

Στο 3' άκρο ενός ιντρονίου εντοπίζονται τρία στοιχεία αλληλουχίας κρίσιμα για το μάτισμα, και συγκεκριμένα: η αλλουλουχία διακλάδωσης, η οδός πολυπυριμιδίνης και το συντηρημένο δι-νουκλεοτίδιο AG στη 3' θέση ματίσματος [259]. Αν και έχουν αναφερθεί αρκετές μεταλλάξεις στις θέσεις ματίσματος 5' και 3' που επηρεάζουν τη μεταγραφή [260], μόνο λίγες μεταλλάξεις στη θέση διακλάδωσης έχουν εντοπιστεί που οδηγούν στην εκδήλωση γενετικής νόσου. Η αλληλουχία διακλάδωσης, εντοπισμένη μεταξύ -9 και -400 bp από την 3' θέση ματίσματος έχει το μοτίβο YUNAY σε ανθρώπους και θεωρείται ως απαραίτητο συστατικό για τον πρώιμο σχηματισμό του συμπλόκου συναρμογής [261]. Καθώς οι ακολουθίες της θέσης διακλάδωσης είναι πολύ υποβαθμισμένες, ο ακριβής εντοπισμός τους είναι εξαιρετικά δύσκολο να προσδιοριστεί. Παλαιότερες μελέτες έδειχναν ότι οι μεταλλάξεις στην αλληλουχία διακλάδωσης ενδέχεται να μειώσουν την απόδοση ματίσματος και να οδηγήσουν σε μη κανονικό μάτισμα [262, 263], αλλά ορισμένα pre-mRNA με

τροποποιημένες ή διαγραμμαμένες θέσεις διακλάδωσης διεκπεραιώνουν την διαδικασία του ματίσματος [264]. Η αποτυχία κατάργησης του ματίσματος αποδίδεται στη χρήση εναλλακτικών αλληλουχιών διακλάδωσης [265, 266].

Σύμφωνα με το βιοπληροφορικό εργαλείο ASSP η 5' θέση ματίσματος είναι η πιο ισχυρή θέση ματίσματος οπότε η μετάλλαξη c.890-14C>G δρα σε συνδυασμό με την προϋπάρχουσα κανονική 5' θέση ματίσματος, καθώς δεν αναγνωρίζεται άλλη πιο ισχυρή μη-κανονική 5' θέση ματίσματος που δυνητικά θα ενεργοποιούνταν από την μετάλλαξη. Αυτό θα μπορούσε να έχει σαν αποτέλεσμα την προσθήκη στο παραγόμενο mRNA 13 νουκλεοτιδίων. Οι επιπλέον βάσεις που προστίθεται δεν διαθέτουν νέο κωδικόνιο ATG, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν κωδικόνιο έναρξης κατά τη μετάφραση.

Η περιοχή στην οποία εντοπίζεται η παραλλαγή χαρακτηρίζεται ως μη διατηρημένη, βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου GERP. Το εργαλείο SpliceAid 2 τροποποιεί το μεταγραφικό μοτίβο που αναγνωρίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες hnRNP K, SRp20 και YB-1 με αποτέλεσμα να διακόπτει τη σύνδεση τους στην αντίστοιχη γονιδιακή περιοχή.

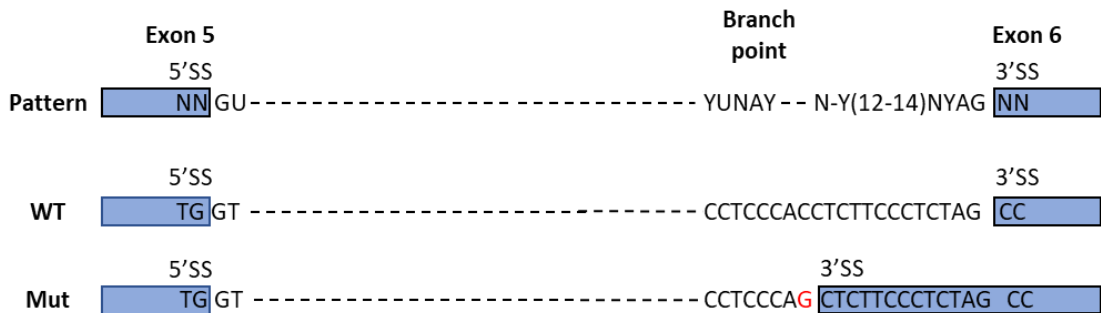
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο μεταγραφικός παράγοντας hnRNP K είναι μία από τις κύριες πρωτεΐνες δέσμευσης στο pre-mRNA. Η hnRNP K είναι μια πρωτεΐνη σύνδεσης RNA/DNA που είναι στόχος πολλαπλών κινασών ή προσλήψεων παραγόντων που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος και στην έκφραση γονιδίου. Το hnRNP K έχει πολλαπλές πυρηνικές και κυτοσολικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της μεταγραφής [267], του ματίσματος [268], της σίγασης του mRNA [269], της σταθερότητας του mRNA και της μετάφρασης [270]. Αυτό που κάνει το hnRNP K διαφορετικό από τα άλλα hnRNPs είναι η λειτουργική του ευελιξία που διαμεσολαβεί από την ικανότητα αλληλεπίδρασης με πολλαπλές πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο, το hnRNP K μπορεί να τοποθετηθεί στο κέντρο ενός τεράστιου δικτύου αλληλεπίδρασης, επιτρέποντάς του να παίζει πολλαπλούς ρόλους σε διαφορετικές κυτταρικές διαδικασίες.

Οι πρωτεΐνες πλούσιες σε Ser/Arg (SR) αποτελούν παράγοντες ματίσματος [271]. Οι SR πρωτεΐνες παρουσιάζουν διπλή λειτουργικότητα στο pre-mRNA και στο εναλλακτικό μάτισμα. Η κύρια λειτουργία τους ασκείται στο επίπεδο της επιλογής της θέσης ματίσματος. Αλληλοεπιδρούν με ESEs σχηματίζοντας έτσι ένα φράγμα που αποτρέπει την παράλειψη του εξωνίου, διασφαλίζοντας έτσι τη σωστή γραμμική σειρά των εξωνίων. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες SR ρυθμίζουν την επιλογή των εναλλακτικών θέσεων ματίσματος, προωθώντας έτσι την συμπερίληψη εναλλακτικών εξωνίων. Οι πρωτεΐνες SR ανταγωνίζονται τη δραστικότητα των hnRNPs, οι οποίες δεσμεύονται σε ESS [272]. Το SRp20, το οποίο ονομάζεται επίσης SRSF3, είναι το μικρότερο μέλος της υψηλής συντηρημένης οικογένειας συντελεστών ματίσματος πλούσια σε SR. Το SRp20 ρυθμίζει τη σύνθεση πολλών γονιδίων [273, 274, 275, 276, 277]. Εκτός από τη ρύθμιση του ματίσματος του RNA, το SRp20 συμμετέχει επίσης σε άλλες σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Έχει εμπλακεί στη μετάφραση πρωτεϊνών [278], στον τερματισμό της μεταγραφής [279] και στη σηματοδότηση ινσουλίνης [280].

Η πρωτεΐνη δέσμευσης YB-1 εμπίπτει σε μια ομάδα πρωτεϊνών που δεν ακολουθούν τον κλασικό κανόνα «μία πρωτεΐνη-μία λειτουργία» αλλά έχει πολλές λειτουργίες. Το YB-1 συμμετέχει σε μία ευρεία ποικιλία γεγονότων που εξαρτώνται από το DNA/RNA, συμπεριλαμβανομένης της αποκατάστασης του DNA, της μεταγραφής του pre-mRNA και του ματίσματος, τη ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA και τη μετάφραση [281].

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, η μετάλλαξη εντοπίστηκε σε έναν ασθενή με φαινότυπο ιδιαίτερα συγκεκριμένο για το C1-INH-HAE (PP4). Ανιχνεύτηκε στο σύνολο των ασθενών-μελών της οικογένειας που εξετάστηκαν στο γονίδιο *SERPING1* το οποίο είναι γνωστό ότι προκαλεί το συγκεκριμένο νόσημα (PP1), ενώ απουσιάζει από τη βάση πληθυσμιακών δεδομένων gnomAD (PM2). Η

μετάλλαξη c.890-14C>G χαρακτηρίζεται ως παθογονική από το μεγαλύτερο μέρος των βιοπληροφορικών εργαλείων (PP3). Ανιχνεύεται σε ένα γονίδιο που έχει μικρό ποσοστό από καλοήθεις μεταλλάξεις και στο οποίο οι μεταλλάξεις είναι ένας κοινός μηχανισμός ασθένειας (PP2). Λαμβάνοντας υπόψη τις κατευθυντήριες οδηγίες ACMG-AMP η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως πιθανώς παθογονική [215].



**Εικόνα 37:** Γραφική παρουσίαση της επίδρασης της παραλλαγής c.890-14C>G σύμφωνα με τη βιοπληροφορική ανάλυση. Η παραλλαγή προβλέπεται να σχηματίζει μία εναλλακτική 3' θέση ματίσματος που οδηγεί σε ένα τροποποιημένο μεταλλαγμένο RNA μεγαλύτερο από το φυσιολογικό.

Η μελέτη επιβεβαίωσε την αρχική υπόθεση ότι οι ιντρονικές μεταλλάξεις θα μπορούσαν να είναι η αιτία της νόσου C1-INH-HAE, στις περιπτώσεις όπου οι συμβατικές μέθοδοι μοριακής ανάλυσης δεν μπόρεσαν να αποκαλύψουν την αιτιατή μετάλλαξη, επισημαίνοντας ένα ακόμη πλεονέκτημα του NGS στη μοριακή ανάλυση αυτών των ασθενών [302]. Βάση της συγκεκριμένης μελέτης συμπεραίνεται ότι οι μέθοδοι προσδιορισμού αλληλουχίας υψηλής απόδοσης πρέπει να εκτελούνται σε περιπτώσεις C1-INH-HAE όπου οι τυπικές προσεγγίσεις αποτυγχάνουν να αποκαλύψουν την αιτιατή μετάλλαξη.

Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί ότι από το σύνολο των δεκαπέντε ασθενών των οποίων το DNA αλληλουχήθηκε, μόνο σε τέσσερεις εξ αυτών βρέθηκαν αιτιατές (παθογονικές/ πιθανώς παθογονικές) μεταλλάξεις. Οι υπόλοιποι έντεκα ασθενείς στους οποίους δεν ανιχνεύτηκαν ιντρονικές μεταλλάξεις στις περιοχές του γονιδίου *SERPING1* που εξετάστηκαν θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω σε μελλοντικές ερευνητικές εργασίες. Σημαντικό, θα ήταν να εξεταστούν οι περιοχές τις οποίες αδυνατεί να καλύψει το panel γονιδίων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη [216]. Οι συγκεκριμένες περιοχές εντοπίζονται κυρίως στο ιντρόνιο 3, 4 και 6, όπου η αλληλουχία παρουσιάζει πληθώρα ομοπολυμερών περιοχών. Ορισμένες τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς που βασίζονται σε αλληλουχία-με-σύνθεση (NGS) έχουν σχετικά υψηλό ποσοστό σφάλματος στον προσδιορισμό ομοπολυμερών περιοχών, λόγω των αρχών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση, με αποτέλεσμα οι περιοχές αυτές να αποφεύγονται κατά το σχεδιασμό του panel [282].

Επιπρόσθετα, ακόμη και η πιο σχολαστική αλληλούχηση του συνόλου των κωδικοποιουσών και μη περιοχών του γονιδίου δεν θα μπορούσε να ανιχνεύσει μια παθογόνο παραλλαγή στα ρυθμιστικά μοτίβα που λειτουργούν σε μεγάλες αποστάσεις από το γονίδιο και θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνα για την ασθένεια. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί της γονιδιακής έκφρασης περιλαμβάνουν διαφορετικά κυκλικά κυκλώματα με πολλαπλά ειδικά συστατικά. Έτσι, μηχανισμοί που παρεμβαίνουν στην έκφραση του γονιδίου *SERPING1*, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη εκτός από την διερεύνηση μεταλλάξεων σε μη κωδικοποιούσες περιοχές.

Τέλος, θα πρέπει να εξεταστεί η περίπτωση της συνύπαρξης δύο ή περισσότερων μεταλλάξεων και η επιρροή αυτών στο παραγόμενο προϊόν. Δυνητικά θα μπορούσε μία παραλλαγή, η οποία έχει χαρακτηριστεί ως καλοήθεις και εντοπίζεται είτε στην εξωνική είτε στην ιντρονική περιοχή να δρα σε συνδυασμό με μία διαφορετική μετάλλαξη και να επηρεάζει την εκδήλωση του C1-INH-HAE. Μέχρι σήμερα, έχει διερευνηθεί η επίπτωση του συνδυασμού δύο μεταλλάξεων σε άλλα νοσήματα, είτε αυτές εντοπίζονται στις ιντρονικές είτε στις εξωνικές θέσεις, αλλά δεν έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην συνδυαστική δράση περισσότερων μεταλλάξεων και η επίπτωση αυτών στη μεταγραφική διαδικασία και στο μεταγραφόμενο προϊόν [283]. Στο C1-INH-HAE έχει εξεταστεί η ταυτόχρονη συνύπαρξη μίας παθολογικής εξωνικής μετάλλαξης με γνωστούς πολυμορφισμούς σε διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της βραδυκινίνης και η τροποποίηση της κλινικής έκφρασης του C1-INH-HAE [57], αλλά δεν έχει μελετηθεί η ταυτόχρονη δράση δύο μεταλλάξεων οι οποίες θα μπορούσαν να δρουν συνδυαστικά.

## 7.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *F12*

Το 2000 μια νέα μορφή αγγειοιδήματος περιεγράφηκε σε ασθενείς χωρίς ποσοτική ή ποιοτική ανεπάρκεια C1-INH [126, 127]. Αυτός ο τύπος ΗΑΕ, παρουσιάζει παρόμοιο κλινικό φαινότυπο με αυτόν των τύπων I και II. Ένας σημαντικός παράγοντας που προκαλεί αυτή τη νέα μορφή, η οποία εμφανίζεται κυρίως στις γυναίκες, είναι η έκθεση σε αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων. Ερευνώντας το γενετικό υπόβαθρο αυτού του νοσήματος ανιχνεύτηκαν τέσσερις μεταλλάξεις στο εξόνιο 9 του γονιδίου *F12*, που κωδικοποιεί τον παράγοντα πήξης XII, c.983C>A (p.Thr328Lys) και c.983C>G (p.Thr328Arg) [133], c.971\_1018+24del72 [136, 138] και c.892\_909dup [139]. Η πρωτεΐνη FXII, μια πρωτεάση σερίνης, εμπλέκεται στην απελευθέρωση της βραδυκινίνης, και ως ενεργοποιημένο ένζυμο έχει την ικανότητα να διασπά την προκαλλικρεΐνη παράγοντας καλλικρεΐνη, ένα ένζυμο υπεύθυνο για την απελευθέρωση βραδυκινίνης από κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους.

Η πρώτη μελέτη που καθόρισε τη λειτουργία αυτών των μεταλλάξεων έδειξε ότι τα δείγματα πλάσματος από ασθενείς που έφεραν τη μετάλλαξη c.983C>A (p.Thr328Lys) παρουσίασαν αυξημένη αμιδολυτική δραστηριότητα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μεταλλάξεις προκαλούν κέρδος λειτουργίας [134]. Μεταγενέστερες μελέτες αποκάλυψαν ότι αυτή η αυξημένη δραστηριότητα FXII που μετρήθηκε στο πλάσμα των ασθενών οφείλεται στην αυξημένη ικανότητα ενεργοποίησης του μεταλλαγμένου FXII. Οι Björkqvist et al [284] κατέδειξαν ένα αυξημένο ποσοστό ενεργοποίησης του FXII που προκαλείται από τις σημειακές μεταλλάξεις χρησιμοποιώντας χαμηλές δόσεις θειικής δεξτράνης που ήταν επαρκείς ώστε να προκαλέσουν σχηματισμό FXIIa σε φορείς των μεταλλάξεων αλλά όχι σε υγιή άτομα, ωστόσο, η αύξηση της συγκέντρωσης θειικής δεξτράνης εξάλειψε τη διαφορά. Οι δύο σημειακές μεταλλάξεις και η έλλειψη των 72 bp εισάγουν νέες θέσεις στην πρωτεΐνη που είναι ευαίσθητες στην ενζυματική διάσπαση και ως εκ τούτου στην ενεργοποίηση από την πλασμίνη, και αυτή η υπερβολική ενεργοποίηση καθιστά προσωρινά το C1-INH αναποτελεσματικό στην παρεμπόδιση της υπερπαραγωγής βραδυκινίνης [181].

Οι Ivanov et al [285] υποστηρίζουν έναν μηχανισμό για την ενισχυμένη παραγωγή βραδυκινίνης σε ασθενείς που φέρουν τις δύο σημειακές μεταλλάξεις που περιλαμβάνει μια συγκεκριμένη αλληλουχία πρωτεολυτικών αντιδράσεων, όπως προτάθηκε πρόσφατα από τους Jukema et al [286]. Το αρχικό βήμα αποτελεί η δημιουργία μιας περικομμένης μορφής FXII ( $\delta$ FXII) από πρωτεάσες που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της πήξης του αίματος, αφαιρώντας την περιοχή της



μη καταλυτικής βαριάς αλυσίδας της πρωτεΐνης. Αυτή θα μπορούσε να καταλύεται από οποιαδήποτε πρωτεάση όπως η πλασμίνη, η θρομβίνη ή το FXIa. Το προκύπτον κομμένο FXII ενεργοποιείται από την καλλικρεΐνη πιο γρήγορα από ότι το φυσιολογικό FXII, επιταχύνοντας την παραγωγή καλλικρεΐνης και βραδυκινίνης με τρόπο ανεξάρτητο από την επιφάνεια [287, 288].

Για ασθενείς με nC1-INH-HAE, η διάγνωση FXII-HAE, PLG-HAE, ANGPT1-HAE, KNG1-HAE, MYOF-HAE και MHS3OST6-HAE μπορεί να εξακριβωθεί μόνο μετά την γονοτύπηση των αντίστοιχων γονιδίων, καθώς δεν υφίσταται βιοχημικές εξετάσεις που να μπορούν να διαγνώσουν τους συγκεκριμένους τύπους HAE. Επιπλέον, η διάγνωση του U-HAE σε ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα C1-INH εξαρτάται από την απουσία παθογόνων παραλλαγών σε αυτά τα γονίδια. Σε περίπου 40 περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι αρχικά είχαν αρχικά διαγνωστεί ότι νοσούν από InH-AAE, μετά την γονοτύπηση των γονιδίων *F12*, *PLG*, και *ANGPT1*, βρέθηκε ότι πάσχουν από FXII-HAE, PLG-HAE ή ANGPT1-HAE, αντίστοιχα [289]. Ως εκ τούτου, συνιστάται η γονοτύπηση των γονιδίων *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF* και *MHS3OST6* για την επιβεβαίωση της διάγνωσης του InH-AAE. Τέλος, υπάρχουν περιστατικά C1-INH-HAE, τα οποία εκφράστηκαν κλινικά μετά τη λήψη αναστολέων ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης και διαγνώστηκαν αποκλειστικά από τη μέτρηση των επιπέδων C1-INH και C4. Αυτό θα μπορούσε να ισχύει και στην περίπτωση του nC1-INH-HAE, λαμβάνοντας υπόψη και την μεγαλύτερη ηλικία εκδήλωσης των πρώτων συμπτωμάτων. Έτσι, ο γονότυπος των *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF* και *MHS3OST6* θα πρέπει να εξετάζεται για τη διάγνωση του ACEI-AAE.

Από το 2006, όταν περιεγράφηκαν για πρώτη φορά οι μεταλλάξεις που οδηγούν στην εμφάνιση του FXII-HAE [133], οι ασθενείς και οι οικογένειες τους οι οποίοι νοσούσαν εντοπίστηκαν χρησιμοποιώντας γενετικές μεθόδους τυποποίησης. Σε αυτές περιλαμβάνονται μεγάλες οικογένειες δύο ή περισσότερων γενιών που προηγουμένως είχαν διαγνωστεί με nC1-INH-HAE άγνωστης προέλευσης. Με βάση τις παρατηρήσεις της Angioedema Outpatient Service στη Γερμανία, εκτιμήθηκε ότι ο επιπολασμός του FXII-HAE στη Γερμανία σε 1: 400.000 [290]. Η συνολική αναλογία ανδρών προς γυναικών εμφανίζεται περίπου 1:10. Σε μια ομάδα με 42 ασθενείς από τη Βραζιλία η αναλογία ήταν 1:6 [157]. Ο λόγος για τον υψηλότερο επιπολασμό ανδρών ασθενών στη Βραζιλία παραμένει άγνωστος. Το FXII-HAE παρουσιάζει ατελή διεισδυτικότητα, η οποία υπολογίζεται περίπου 66,3%: 4,0% στους άντρες, έναντι 86,1% στις γυναίκες [290]. Επίσης, η εκδήλωση των συμπτωμάτων παρουσιάζει καθυστέρηση σε σχέση με το C1-INH-HAE, καθώς εμφανίζονται συνήθως στην ηλικία των 20 ετών με εύρος 1,65 έτη [290].

Καθώς το σύνολο των ανιχνευόμενων παθογονικών μεταλλάξεων που οδηγούν σε FXII-HAE εντοπίζονται στο εξώνιο 9, συνιστάται στην μοριακή διάγνωση ρουτίνας η αλληλουχία αποκλειστικά του εξωνίου 9 σε ασθενείς με nC1-INH-HAE. Παρόλα αυτά, η διαρκής ανάπτυξη των μεθόδων αλληλουχίας παρέχει την δυνατότητα εξέτασης του συνόλου των εξωνικών περιοχών των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι της βραδυκινίνης, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να αναδείξει νέες μεταλλάξεις στο γονίδιο *F12* σε εξώνια πέραν του εξωνίου 9. Ο χαρακτηρισμός αυτών των μεταλλάξεων αποτελεί μία δύσκολη υπόθεση. Η χαμηλή διεισδυτικότητα του νοσήματος και η καθυστέρηση της εμφάνισης των συμπτωμάτων αποτελούν δύο παράγοντες που περιπλέκουν την ερμηνεία των νέων μεταλλάξεων στο γονίδιο *F12*, καθώς οι οικογενειακές μελέτες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοναδικό κριτήριο παθογονικότητας και πρέπει να συνδυαστούν με τη χρήση πολλαπλών βιοπληροφορικών εργαλείων. Βάση των διεθνών οδηγιών για την διαχείριση του κληρονομικού αγγειοιδήματος οι τυχαία ανιχνευόμενες παραλλαγές που σχετίζονται με HAE θα πρέπει να αξιολογούνται από την προαναφερθείσα ομάδα εμπειρογνομόνων της ClinGen

σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες ACMG/AMP, μετά την κατάθεση τους στο ClinVar από το εκάστοτε ερευνητικό εργαστήριο [37].

Με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *F12* σε ασθενείς με κληρονομικό αγγειοίδημα, αλληλουχήθηκε το σύνολο της μεταφρασμένης περιοχής του γονιδίου *F12* σε 197 ασθενείς με nC1-INH-HAE, 161 ασθενείς με C1-INH-HAE και σε 46 δείγματα από υγιή μέλη των οικογενειών τους. Η ανάλυση ολόκληρης της μεταφραζόμενης περιοχής είναι σημαντική για τον εντοπισμό νέων παραλλαγών που πιθανώς επηρεάζουν την έκφραση του HAE.

Η αλληλούχηση του συνόλου των εξωνικών περιοχών του γονιδίου *F12* οδήγησε στην ανίχνευση 13 διαφορετικών μεταλλάξεων. Ο Πίνακας 16 παρουσιάζει την εκτίμηση της παθογονικότητας τους και τα κριτήρια ACMG-AMP για των χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων.

**Πίνακας 16:** Η εκτίμηση της παθογονικότητας των ανιχνευμένων μεταλλάξεων στο γονίδιο *F12* με βάση τα κριτήρια ACMG-AMP για των χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων και η καταχώρηση του στη βάση ClinVar.

Μετάλλαξη	ClinVar	Κριτήρια	Χαρακτηρισμός
c.-4T>C	1167	BA1, BS1, BS2, BP5, BP6	Καλοήθης
c.41T>C	983442	BS1, BP5	Πιθανώς Καλοήθης
c.418C>G	353001	BS1, BS2, BP5, BP6	Καλοήθης
c.530C>T	983439	BS1, BS2, BP4	Καλοήθης
c.619G>C	256310	BA1, BS1, BS2, BP4, BP5, BP6	Καλοήθης
c.711C>T	352999	BS1, BS2, BP4, BP5, BP6, BP7	Καλοήθης
c.756C>T	352998	BS1, BS2, BP4, BP5, BP6, BP7	Καλοήθης
c.983C>A	1169	PS3, PS4, PM1, PM5, PP1	Παθογονική
c.892_909dup	403709	PM1, PM2, PM4, PP5	Πιθανώς παθογονική
c.1025C>T	352993	BS1, BP4, BP5, BP6	Πιθανώς Καλοήθης
c.1530G>C	983440	PM2, PP3, BS2	Άγνωστης Παθογονικότητας
c.1599A>G	983443	PM2, BP4, BP7	Πιθανώς Καλοήθης
c.1768T>G	983441	PM2, PM5, PP3	Άγνωστης Παθογονικότητας

#### c.-4T>C

Στην πληθυσμιακή ομάδα που εξετάστηκε ανιχνεύτηκε ο λειτουργικός πολυμορφισμός c.-4T>C (rs1801020) στη 5' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *F12* σε συχνότητα αλληλίου παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στη βάση δεδομένων gnomAD, δηλαδή με συχνότητα αλληλομόρφων μεγαλύτερη από 5% (BA1). Στον ευρωπαϊκό πληθυσμό η συχνότητα είναι 75,38% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 65,22%, δηλαδή μεγαλύτερη από την αναμενόμενη για το FXII-HAE (0,00025%) (BS1). Η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε 24 υγιή μέλη των οικογενειών που εξετάστηκαν (BS2) και σε 151 ασθενείς με C1-INH-HAE, 17 INH-HAE, 3 ACEI-HAE και 2 CPN1 (BP5). Στο ClinVar χαρακτηρίζεται ως καλοήθης, με δύο αστέρια, σε πολλαπλές καταχωρήσεις για το κληρονομικό αγγειοίδημα και την νόσο ανεπάρκειας του παράγοντα FXII και χωρίς διενέξεις (BP6). Η θέση στην οποία εντοπίζεται η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου GERP. Ο πολυμορφισμός c.-4T>C έχει συσχετιστεί με ηπιότερη κλινική εικόνα σε ασθενείς με C1-INH-HAE. Αυτό το γεγονός μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση του στη σύνθεση του FXII. Η μετάλλαξη c.-4T>C εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή και δημιουργεί ένα νέο κωδικόνιο έναρξης (ATG) για τη μεταγραφή του mRNA, το οποίο μετατοπίζει το πλαίσιο ανάγνωσης και οδηγεί σε κομμένη πρωτεΐνη [291]. Οι Gianni et al έδειξαν ότι οι φορείς του πολυμορφισμού c.428G>A στο γονίδιο *KLKB1*, όσο και του πολυμορφισμού c.-4T>C στο γονίδιο *F12*

οδηγούν σε καθυστέρηση στην έναρξη της νόσου κατά 8,8 χρόνια και παρουσιάζουν 64% χαμηλότερη πιθανότητα για χρήση μακροχρόνιας προφυλακτικής θεραπείας [177, 292, 293]. Συνοψίζοντας, βάση των ACMG-AMP κριτηρίων η μετάλλαξη c.-4T>C χαρακτηρίζεται ως καλοήθης [215].

#### **c.619G>C**

Ο δεύτερος πολυμορφισμός που ανιχνεύτηκε στο εξώνιο 7 του γονιδίου *F12*, c.619G>C (rs17876030), χαρακτηρίζεται ως καλοήθης βάση των ACMG-AMP κριτηρίων [215]. Η μετάλλαξη ανιχνεύεται στη βάση δεδομένων πληθυσμού gnomAD σε συχνότητα 98,67% στον ευρωπαϊκό πληθυσμό και 95,15% στον παγκόσμιο πληθυσμό, δηλαδή η συχνότητα αλληλίου ξεπερνάει το 5% (BA1) και επομένως μεγαλύτερη από την αναμενόμενη για το FXII-HAE συχνότητα (BS1). Ο πολυμορφισμός έχει ανιχνευτεί σε 24 υγιή μέλη των οικογενειών που εξετάστηκαν (BS2) και σε 160 ασθενείς με C1-INH-HAE, 18 INH-HAE, 3 ACEI-HAE και 3 CPN1 (BP5). Τα δύο βιοπληροφορικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της παθογονικότητας των *F12* μεταλλάξεων, SIFT και PolyPhen2, χαρακτήρισαν την μετάλλαξη ως καλοήθη (BP4). Η συγκεκριμένη θέση στην οποία εντοπίζεται η μετάλλαξη δεν είναι ιδιαίτερα συντηρημένη βάση του εργαλείου GERP. Η μετάλλαξη c.619G>C στη βάση δεδομένων ClinVar χαρακτηρίζεται ως καλοήθης, με βαθμολογία δύο αστέρια, σε πολλαπλές καταχωρήσεις και χωρίς διενέξεις. Το UniProt ταξινομεί αυτήν την παραλλαγή ως καλοήθη, με τις σχετικές δημοσιεύσεις PMID:2888762 [294], PMID:3011063 [295], PMID:3754331 [296], PMID:3877053 [129] και PMID:3886654 [297] (BP6).

#### **c.756C>T**

Η συνώνυμη μετάλλαξη c.756C>T (rs41309752) στο εξώνιο 8 του γονιδίου *F12* χαρακτηρίζεται ως καλοήθης από τα ACMG-AMP κριτήρια [215]. Όπως αναφέρθηκε, η συχνότητα αλληλομόρφου της μετάλλαξης στη βάση δεδομένων gnomAD είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη για το νόσημα (BS1). Η μετάλλαξη έχει παρατηρηθεί σε ένα υγιή συγγενή των οικογενειών που εξετάστηκαν (BS2) και σε 5 δείγματα C1-INH-HAE, δηλαδή σε ασθενείς με διαφορετική μοριακή βάση (BP5). Στο ClinVar η μετάλλαξη έχει χαρακτηριστεί ως καλοήθης, με δύο αστέρια και χωρίς διενέξεις (BP6). Η θέση δεν είναι έντονα διατηρημένη βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου GERP και η μετάλλαξη δεν έχει καμία εμφανή επίπτωση στη διαδικασία του ματίσματος βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου HSF (BP4). Τέλος, η μετάλλαξη αποτελεί μία συνώνυμη παραλλαγή, χωρίς προβλεπόμενη επίπτωση στη διαδικασία του ματίσματος (η παραλλαγή είναι 45 bp πριν από τη θέση ματίσματος) και όπως αναφέρθηκε η θέση δεν είναι συντηρημένη (BP7).

#### **c.711C>T**

Στο εξώνιο 8 του γονιδίου *F12* ανιχνεύτηκε η συνώνυμη μετάλλαξη c.711C>T (rs17876047), η οποία χαρακτηρίζεται ως καλοήθης σύμφωνα με τα ACMG-AMP κριτήρια [215]. Η συχνότητα αλληλομόρφου είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη για το νόσημα (BS1), καθώς στη βάση δεδομένων gnomAD η παγκόσμια συχνότητα είναι 2,275%. Η μετάλλαξη έχει παρατηρηθεί σε ένα υγιή συγγενή των οικογενειών που εξετάστηκαν (BS2) και σε 6 δείγματα C1-INH-HAE, δηλαδή σε ασθενείς με διαφορετική μοριακή βάση (BP5). Στο δημόσιο αρχείο ClinVar η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως καλοήθης, με δύο αστέρια, για το κληρονομικό αγγειοοίδημα και την νόσο ανεπάρκειας του παράγοντα FXII και χωρίς διενέξεις ως προς το θέμα της παθογονικότητας (BP6). Η θέση στην οποία εντοπίζεται η παραλλαγή δεν είναι διατηρημένη βάση του εργαλείου GERP και η μετάλλαξη δεν έχει καμία επίπτωση στη διαδικασία του ματίσματος βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου HSF παρά μόνο τροποποιεί κάποια μοτίβα ESE/ESS (BP4). Τέλος, η μετάλλαξη αποτελεί μία συνώνυμη παραλλαγή, χωρίς προβλεπόμενη επίπτωση στη διαδικασία του ματίσματος και η θέση στην

οποία εντοπίζεται η παραλλαγή δεν είναι συντηρημένη (BP7).

#### **c.1599A>G**

Η συνώνυμη μετάλλαξη c.1599A>G (rs1424350386) στο εξώνιο 13 του γονιδίου *F12* εμφανίζει συχνότητα αλληλίου <0,001%, καθώς δεν έχει ανιχνευτεί σε 125.748 εξωνικές αλληλουχίες και σε 15.708 γονιδιώματα στη βάση gnomAD (PM2). Βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου GERP, η θέση στην οποία εντοπίζεται η παραλλαγή δεν είναι ιδιαίτερα διατηρημένη και η μετάλλαξη δεν τροποποιεί τη διαδικασία του ματίσματος βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου HSF παρά μόνο κάποια μοτίβα ESE/ESS (BP4). Η μετάλλαξη c.1599A>G είναι μία συνώνυμη παραλλαγή, χωρίς προβλεπόμενη επίπτωση στη διαδικασία του ματίσματος και η θέση στην οποία εντοπίζεται δεν είναι συντηρημένη (BP7). Συνοψίζοντας, βάση των ACMG-AMP κριτηρίων η μετάλλαξη c.1599A>G χαρακτηρίζεται ως πιθανώς καλοήθης [215].

Στον πληθυσμό που εξετάστηκε με σκοπό την ανίχνευση μεταλλάξεων στις εξωνικές περιοχές του γονιδίου *F12* εντοπίστηκαν οι δύο δημοσιευμένες παθογονικές μεταλλάξεις, c.983C>A και c.892\_909dup που έχουν συσχετιστεί βιβλιογραφικά με το FXII-HAE.

#### **c.983C>A**

Η c.983C>A (p.Thr328Lys, rs118204456) στο εξώνιο 9 του γονιδίου *F12* έχει ανιχνευτεί συνολικά στη βιβλιογραφία σε 531 άτομα, εκ των οποίων 159 δεν έχουν εμφανίσει συμπτώματα [133, 134, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164]. Η μετάλλαξη εντοπίζεται στη πλούσια σε προλίνη περιοχή στην οποία έχουν ανιχνευτεί όλες οι παθογονικές μεταλλάξεις που έχουν συνδεθεί με το νόσημα (PM1) και αποτελεί την πιο συχνά εμφανιζόμενη μετάλλαξη που έχει συσχετιστεί με το FXII-HAE, βάση λειτουργικών μελετών που υποστηρίζουν την παθογονικότητα της (PS3). Στο ClinVar η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως παθογονική ως προς το FXII-HAE σε τέσσερις διαφορετικές καταχωρήσεις, με βαθμολογία δύο αστεριών. Στην ίδια θέση έχει εντοπιστεί η σημειακή μετάλλαξη c.983C>G σε ασθενείς με κληρονομικό αγγειοοίδημα (PM5) [133]. Η c.983C>A ανιχνεύτηκε σε τρεις γυναίκες ασθενείς, μέλη δύο διαφορετικών οικογενειών, οι οποίες εμφάνιζαν επεισόδια αγγειοοιδήματος είτε κατά τη διάρκεια των περιόδων κύησης είτε μετά τη χορήγηση οιστρογόνων (PP1). Στη βάση πληθυσμιακών δεδομένων gnomAD η συχνότητα αλληλίου της μετάλλαξης στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 0,0004271% (PS4). Βάση τα κριτήρια ACMG-AMG η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως παθογονική [215].

#### **c.892\_909dup**

Η δημοσιευμένη μετάλλαξη c.892\_909dup [139] στο εξώνιο 9 του γονιδίου *F12*, η οποία οδηγεί σε διπλασιασμό 6 αμινοξέων στην πρωτεΐνη σε μία περιοχή που δεν περιέχει ομοπολυμερή, ανιχνεύτηκε στην υπό διερεύνηση πληθυσμιακή ομάδα σε μία ουγγρική οικογένεια (PM4). Από τα πέντε μέλη της οικογένειας που ήταν φορείς της μετάλλαξης μόνο δύο γυναίκες έχουν παρουσιάσει επεισόδια οιδήματος, το οποίο υποδεικνύει ότι περαιτέρω γενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί ενδεχομένως να επηρεάζουν την έκφραση του νοσήματος. Η ύπαρξη της μετάλλαξης στην πλούσια σε προλίνη περιοχή στην οποία εντοπίζονται και οι υπόλοιπες τρεις παθογονικές παραλλαγές που έχουν συσχετιστεί με το FXII-HAE, υποδηλώνει παρόμοιες λειτουργικές συνέπειες (PM1). Η συχνότητα αλληλίου που εμφανίζει η μετάλλαξη είναι <0,001%, καθώς δεν έχει ανιχνευτεί σε 125.748 εξωνικές αλληλουχίες και σε 15.708 γονιδιώματα στη βάση gnomAD (PM2). Στο ClinVar η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως παθογονική ως προς το FXII-HAE σε μία καταχώρηση, χωρίς αστέρια (PP5). Λαμβάνοντας υπόψη τα άνωθεν η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως

πιθανώς παθογονική βάση των ACMG-AMP κριτηρίων [215].

#### **c.41T>C**

Η μετάλλαξη c.41T>C (p.Leu14Ser, rs143809932) στο εξώνιο 1 του γονιδίου *F12* χαρακτηρίζεται ως πιθανώς καλοήθης βάση των κριτηρίων ACMG-AMP [215]. Η συχνότητα αλληλίου της μετάλλαξης στη βάση πληθυσμιακών δεδομένων gnomAD είναι 0,002% σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης και 0,01556% στον παγκόσμιο πληθυσμό, δηλαδή μεγαλύτερη από την αναμενόμενη για το FXII-HAE (0,00025%) (BS1). Στον πληθυσμό που εξετάστηκε η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε έναν ασθενή με C1-INH-HAE, δηλαδή σε νόσημα με διαφορετική μοριακή βάση (BP5).

#### **c.1025C>T**

Η μετάλλαξη c.1025C>T (p.Pro342Leu, rs2230939) ανιχνεύτηκε στο εξώνιο 10 του γονιδίου *F12* σε έναν ασθενή με C1-INH-HAE (BP5). Εντοπίζεται στην πλούσια σε προλίνη περιοχή της πρωτεΐνης. Στη βάση πληθυσμιακών δεδομένων gnomAD η συχνότητα αλληλίου της μετάλλαξης στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 0,13% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 0,07692% (BS1). Σε μία καταχώρηση στη βάση ClinVar χαρακτηρίζεται ως καλοήθης για το FXII-HAE (BP6). Τέλος, τα δύο βιοπληροφορικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της παθογονικότητας των μεταλλάξεων στο γονίδιο *F12*, SIFT και PolyPhen2, χαρακτήρισαν την μετάλλαξη ως καλοήθη (BP4). Βάση του βιοπληροφορικού εργαλείου GERP, η θέση στην οποία εντοπίζεται η μετάλλαξη δεν είναι καθόλου διατηρημένη. Συνοψίζοντας τα παραπάνω ACMG-AMP κριτήρια η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως πιθανώς καλοήθης [215].

#### **c.418C>G**

Στο εξώνιο 6 του γονιδίου *F12* ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη c.418C>G (p.Leu140Val, rs35515200), η οποία βάση των κριτηρίων ACMG-AMP χαρακτηρίζεται ως καλοήθης [215]. Όπως αναφέρθηκε, η μετάλλαξη εντοπίστηκε σε έναν ασθενή με C1-INH-HAE, δηλαδή σε νόσημα με διαφορετική μοριακή βάση (BP5) και σε δυο ασθενείς με nC1-INH-HAE. Με σκοπό τη διερεύνηση της παθογονικότητας της μετάλλαξης έλαβαν χώρα δύο οικογενειακές μελέτες και η μετάλλαξη ανιχνεύτηκε σε τρία υγιή άτομα (BS2). Η συχνότητα αλληλίου της στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 0,35% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 0,2232% στη βάση δεδομένων gnomAD (BS1). Στο ClinVar (353001) υπάρχουν τρεις καταχωρήσεις που χαρακτηρίζουν τη μετάλλαξη ως καλοήθη (BP6).

#### **c.530C>T**

Η μετάλλαξη c.530C>T (p.Ala177Val, rs144821595) στο εξώνιο 7 του γονιδίου *F12* χαρακτηρίζεται βάση των κριτηρίων ACMG-AMP ως καλοήθης [215]. Εντοπίστηκε σε δύο ασθενείς με nC1-INH-HAE και σε τρία υγιή μέλη της οικογένειας ενός εκ των ασθενών (BS2). Στην πληθυσμιακή βάση δεδομένων gnomAD η συχνότητα της στον ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι 0,005960% και στον παγκόσμιο πληθυσμό είναι 0,004474%, δηλαδή μεγαλύτερη από την αναμενόμενη για το υπό μελέτη νόσημα (0,00025%) (BS1). Τα δύο βιοπληροφορικά εργαλεία, SIFT και PolyPhen2, που χρησιμοποιήθηκαν χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη ως καλοήθη. Το βιοπληροφορικό εργαλείο GERP χαρακτήρισε τη θέση που εντοπίζεται η μετάλλαξη ως καθόλου συντηρημένη (BP4).

#### **c.1768T>G**

Στο εξώνιο 14 του γονιδίου *F12* ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη c.1768T>G (p.Cys590Gly) σε έναν ασθενή με υποτροπιάζον αγγειοίδημα ασαφούς προέλευσης. Η μετάλλαξη p.Cys590Gly

εντοπίζεται στον καταλυτικό τομέα της πρωτεΐνης. Η συχνότητα αλληλίου της μετάλλαξης είναι <0,001%, καθώς δεν έχει ανιχνευτεί στις 125.748 εξωνικές αλληλουχίες και στα 15.708 γονιδιώματα στη βάση πληθυσμιακών δεδομένων gnomAD (PM2). Τα δύο βιοπληροφορικά εργαλεία, SIFT και PolyPhen2, που χρησιμοποιήθηκαν χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη ως παθογονική (PP3). Το εργαλείο GERP χαρακτήρισε την περιοχή στην οποία εντοπίζεται η μετάλλαξη ως συντηρημένη. Στην ίδια θέση έχει εντοπιστεί μία ακόμα μετάλλαξη η οποία έχει ταξινομηθεί ως παθογόνος από το UniProt [298] (PM5). Συνοψίζοντας τα παραπάνω ACMG-AMP κριτήρια η μετάλλαξη χαρακτηρίζεται ως άγνωστης παθογονικότητας [215].

### **c.1530G>C**

Η μετάλλαξη c.1530G>C (p.Glu510Asp) στο εξόνιο 12 του γονιδίου *F12* χαρακτηρίζεται βάση των κριτηρίων ACMG-AMP ως παραλλαγή άγνωστης παθογονικότητας [215]. Η παραλλαγή ανιχνεύτηκε σε μία ασθενή με αγγειοίδημα ασαφούς προέλευσης και σε τρία υγιή άτομα που ανήκαν στην οικογένεια της ασθενούς (BS2, PM2). Εντοπίζεται στον καταλυτικό τομέα της πρωτεΐνης. Τα βιοπληροφορικά εργαλεία SIFT και PolyPhen2 χαρακτηρίζουν την μετάλλαξη ως παθογονική (PP3). Η συχνότητα αλληλίου της μετάλλαξης είναι μικρότερη από 0,001%, καθώς δεν έχει ανιχνευτεί στις 125.748 εξωνικές αλληλουχίες και στα 15.708 γονιδιώματα στη βάση πληθυσμιακών δεδομένων gnomAD.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι δεν εντοπίστηκαν μεγάλες βλάβες, ελλείψεις και διπλασιασμοί, στο γονίδιο *F12*.

### **7.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Οι τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενεάς έχουν φέρει επανάσταση στον τομέα της γονιδιωματικής και έχουν αποδειχθεί ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο [18, 19, 20, 299, 300]. Η εφαρμογή προσδιορισμού αλληλούχησης DNA υψηλής απόδοσης, συμπεριλαμβανομένης της αλληλούχησης ολόκληρου γονιδιώματος (WGS), της αλληλούχησης των κωδικοποιουσών περιοχών (WES) και της στοχευμένης αλληλούχησης NGS με τη χρήση panel συγκεκριμένων γονιδίων δίνουν την δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης μεγάλου αριθμού γονιδίων που δυνητικά μπορεί να σχετίζονται με το HAE [301, 302]. Με την εφαρμογή της γονιδιωματικής στη διάγνωση του HAE προσφέρεται μια ευκαιρία για να επιταχυνθεί η διάγνωση ασθενών.

Οι ασθενείς με αγγειοίδημα συχνά διαγιγνώσκονται λανθασμένα, με το ποσοστό εσφαλμένης διάγνωσης να ανέρχεται στο 50% [303]. Η αρχική εσφαλμένη διάγνωση οδηγεί σε έναν αριθμό περιττών διαγνωστικών διαδικασιών, το οποίο διευρύνει ακόμα περισσότερο τον χρόνο διάγνωσης έως και 10 χρόνια [304, 305, 306, 307].

Παρά το γεγονός ότι οι διεξαγόμενες μελέτες τονίζουν την ύψιστη σημασία των γενετικών ερευνών σε ασθενείς με αγγειοίδημα, η αρχική διάγνωση του HAE εξακολουθεί να περιλαμβάνει μόνο την εξέταση των πρωτεϊνών C4 και C1-INH. Ενώ η διάγνωση του nC1-INH-HAE θεωρείται επί του παρόντος διάγνωση αποκλεισμού, επειδή βασίζεται μόνο στα κλινικά χαρακτηριστικά και στο οικογενειακό ιστορικό [308], ενώ δεν υπάρχουν επιβεβαιωτικές εργαστηριακές δοκιμές [302]. Η γενετική δοκιμή θεωρείται αποκλειστική εξέταση για τους FXII-HAE, PLG-HAE, ANGPT1-HAE, KNG1-HAE, MYOF-HAE και HS3OST6-HAE [37].

Συμπερασματικά, η αλληλούχηση DNA υψηλής απόδοσης προσφέρει ένα ισχυρό εργαλείο στον εντοπισμό γενετικών αιτιών για πολλές σπάνιες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του HAE, που ήταν προηγουμένως αδύνατη με τις κλασικές προσεγγίσεις. Επομένως, η γονιδιωματική ως

πρωτεύον διαγνωστικό εργαλείο θα ωφελήσει τους ασθενείς με ΗΑΕ και θα μειώσει τις καθυστερήσεις στη διάγνωση [302].

Ωστόσο, η ανίχνευση βαθιών ιντρονικών μεταλλάξεων χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση NGS μπορεί να αποτύχει, καθώς αυτές οι μεταλλάξεις ως επί το πλείστον απορρίπτονται, δεδομένου του υψηλού αριθμού ιντρονικών μεταλλάξεων και την απόσταση αυτών των παραλλαγών από τις κωδικοποιούσες και συντηρημένες περιοχές [69]. Οι διαγνωστικές στρατηγικές NGS στοχεύουν κυρίως στις κωδικοποιούσες και παρακείμενες στα εξώνια ιντρονικές περιοχές [309], οι οποίες συνήθως καλύπτουν έως και 50 bp ιντρονικών αλληλουχιών [310, 311]. Το WES είναι ικανό μόνο να αναλύει περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, με περιορισμένη κάλυψη των ιντρονικών περιοχών. Αυτός ο περιορισμός στην αλληλούχηση θα μπορούσε να επιλυθεί με αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος. Αλλά ακόμη και όταν χρησιμοποιείτε το WGS, η αφθονία των SNP στα ιντρόνια καθιστά τον εντοπισμό της αιτιατής μετάλλαξης εξαιρετικά δύσκολο. Παρόλα αυτά, συνιστάται ο έλεγχος των ιντρονίων των γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο, εάν η παραλλαγή που προκαλεί το νόσημα δεν αποκαλύπτεται χρησιμοποιώντας προσδιορισμό της εξωνικής αλληλουχίας [312]. Με σκοπό να συνδυαστούν τα πλεονεκτήματα των WGS και του WES, οι Flanagan et al πρότειναν την χρήση ενός στοχευμένου NGS panel γονιδίων που θα συμπεριλαμβάνει ολόκληρα τα ιντρόνια εκτός από τα εξώνια για γονίδια που θεωρούνται απαραίτητα να εξεταστούν στο σύνολο τους [313]. Η στοχευμένη αλληλούχηση NGS, είναι ικανή να καλύπτει ολόκληρη την ποικιλία των γονιδίων ΗΑΕ, συμπεριλαμβανομένων των ιντρονικών περιοχών ενδιαφέροντος, αντιπροσωπεύοντας μία πιο αποδοτική διαγνωστική λύση.

Περίπου το 25% των περιπτώσεων αγγειοιδήματος με φυσιολογικό αναστολέα C1 εστεράσης συνδέεται με μια μετάλλαξη στο γονίδιο *F12*. Αν και δεν υπάρχουν συνεπή επιδημιολογικά δεδομένα για τον επιπολασμό του FXII-ΗΑΕ [314], συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο *F12* αναγνωρίζονται πιο συχνά στο nC1-INH-ΗΑΕ [155, 157]. Οι μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα ως αιτιολογικές για το FXII-ΗΑΕ βρίσκονται στο εξώνιο 9 του γονιδίου *F12* εντός της πλούσιας σε προλίνη περιοχής [133, 136, 139]. Στην εξέταση ρουτίνας των ασθενών με nC1-INH-ΗΑΕ συνιστάται η διερεύνηση μόνο του εξωνίου 9 του γονιδίου *F12* με αλληλούχηση κατά Sanger [157, 164]. Περισσότερες από 40 μεταλλάξεις που περιγράφονται σε ολόκληρο το γονίδιο σχετίζονται με την ανεπάρκεια του παράγοντα XII στο HGMD [315], υποδεικνύοντας ότι οι μεταλλάξεις εκτός του εξωνίου 9 είναι απίθανο να είναι υπεύθυνες για το ΗΑΕ. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η πλούσια σε προλίνη περιοχή του FXII εκτείνεται από το αμινοξύ p.296 έως το p.349, δηλαδή τα τελευταία εννέα αμινοξέα κωδικοποιούνται στο εξώνιο 10. Έτσι, η ανάλυση μόνο του εξωνίου 9 μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ανίχνευσης αιτιατών μεταλλάξεων που δυνητικά θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εκδήλωση ΗΑΕ.

Συμπεραίνεται, ότι οι υψηλές γονιδιωματικές τεχνολογίες διευκολύνουν την εκτεταμένη ανάλυση των γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεση του αγγειοιδήματος. Ωστόσο, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους αντιπροσωπεύει μια μάλλον δύσκολη προσπάθεια. Σε πολλά γονίδια, συμπεριλαμβανομένου του *SERPING1*, η απώλεια λειτουργίας είναι ένας γνωστός μηχανισμός ασθένειας. Στο γονίδιο *F12*, ωστόσο, μόνο συγκεκριμένος αριθμός μεταλλάξεων οδηγούν σε FXII-ΗΑΕ, καθώς οι αιτιολογικές παραλλαγές πρέπει να προκαλούν κέρδος λειτουργίας στην κωδικοποιημένη πρωτεΐνη. Επιπλέον, λόγω της ατελής διεύθυνσης που παρατηρείται στο FXII-ΗΑΕ, ιδιαίτερα στους άνδρες, το οικογενειακό ιστορικό δεν είναι απαραίτητο για τη μοριακή έρευνα, προσθέτοντας ένα ακόμα επίπεδο δυσκολίας. Ελλείψει λειτουργικής και οικογενειακής μελέτης, όλες οι σημειακές μεταλλάξεις, που προβλέπονται να τροποποιήσουν τη δομή της πρωτεΐνης και εντοπίζονται έξω από το εξώνιο 9 χαρακτηρίζονται ως μεταλλάξεις άγνωστης παθογονικότητας.

Τέλος, είναι καίριο να αναφερθεί η σημασία της κοινή χρήσης των δεδομένων αλληλούχησης μέσω μιας κεντρικής βάσης δεδομένων για την επίτευξη ακριβής και συνεπής ερμηνείας των μεταλλάξεων που προσδιορίζονται από γενετικές δοκιμές. Σημαντικό βήμα στην ερμηνεία και στην κοινή χρήση των δεδομένων αποτέλεσε η δημόσια βάση δεδομένων ClinVar, η οποία είναι ένα διεθνές αρχείο που βασίζεται στην υποβολή ερμηνείες των ανιχνευμένων μεταλλάξεων που φιλοξενείται από το NCBI. Για το σκοπό αυτό, τα κλινικά εργαστήρια και οι ερευνητές που εμπλέκονται στη γονοτύπηση των ασθενών με αγγειοίδημα συνιστάται να υποβάλουν όλες τις ανιχνευόμενες μεταλλάξεις στο ClinVar, συμπεριλαμβανομένων των κλινικών ερμηνειών τους και των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για την ταξινόμηση των μεταλλάξεων, με σκοπό η πληροφορία να είναι διαθέσιμη στο σύνολο της επιστημονικής κοινότητας.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

---

---

1. WILLIAMS AH, CRAIG TJ. Perioperative management for patients with hereditary angioedema. *Allergy Rhinol (Providence)*. 2015; 6: 50-55.
2. QUINKE H. Über akutes umschriebenes Hautödem. *Monatsheft Prakt Dermatol*. 1882; 1: 129-131.
3. RESHEF A, KIDON M, LEIBOVICH I. The Story of Angioedema: from Quincke to Bradykinin. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016; 51: 121-139.
4. OSLER W. Hereditary angioneurotic edema. *Am J Med Sci*. 1888; 95: 362.
5. ARNOLDSSON H, BELIN L, HALLBERG L, et al. Hereditary periodic oedema. *Acta Med Scand*. 1967; 181: 115-124.
6. PENSKY J, LEVY LR, LEPOW IH. Partial purification of a serum inhibitor of C'1-esterase. *J Biol Chem*. 1961; 236: 1674-1679.
7. DONALDSON VH, EVANS RR. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: Absence of serum inhibitor of c'1-esterase. *Am J Med*. 1963; 35: 37-44.
8. GÜLBAHAR O, E GERMENIS A. Rediscovery of a forgotten disease: Hereditary Angioedema. *Balkan Med J*. 2021; 38: 68-72.
9. LONGHURST HJ, BORK K. Hereditary angioedema: causes, manifestations and treatment. *Br J Hosp Med*. 2006; 67654-67657.
10. ROSEN FS, ALPER CA, PENSKY J, et al. Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest*. 1971; 50: 2143-2149.
11. CICARDI M, ABERER W, BANERJI A, et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy*. 2014; 69: 602-616.
12. ROSEN FS, PENSKY J, DONALDSON V, et al. Hereditary angioneurotic edema: two genetic variants. *Science*. 1965;148: 957-958.
13. CALDWELL JR, RUDDY S, SCHUR PH, et al. Acquired C1 inhibitor deficiency in lymphosarcoma. *Clin Immunol Immunopathol*. 1972; 1: 39-52.
14. CICARDI M, BANERJI A, BRACHO F, et al. Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *N Engl J Med*. 2010; 363: 532-541.
15. GERMENIS AE, SPELETAS M. Genetics of Hereditary Angioedema Revisited. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016; 51: 170-182.
16. BORK K, WULFF K, HARDT J, et al. Hereditary angioedema caused by missense mutations in the factor XII gene: clinical features, trigger factors, and therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 124: 129-134.
17. BORK K, WULFF K, STEINMÜLLER-MAGIN L, et al. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy*. 2018; 73: 442-450.
18. BAFUNNO V, FIRINU D, D'APOLITO M, et al. Mutation of the angiotensin-converting enzyme 1 gene (*ANGPT1*) associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol*. 2018; 141: 1009-1017.
19. BORK K, WULFF K, ROSSMANN H, et al. Hereditary angioedema cosegregating with a novel kininogen 1 gene mutation changing the N-terminal cleavage site of bradykinin. *Allergy*. 2019; 74: 2479-2481.
20. ARIANO A, D'APOLITO M, BOVA M, et al. A myoferlin gain-of-function variant associates with a new type of hereditary angioedema. *Allergy*. 2020; 75: 2989-2992.
21. BORK K, WULFF K, MÖHL BS, et al. Novel hereditary angioedema linked with a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 6 gene mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2021: S0091-6749(21)00094-4.
22. BORK K, MACHNIG T, WULFF K, et al. Clinical features of genetically characterized types of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: a systematic review of qualitative evidence. *Orphanet J Rare Dis*. 2020; 15: 289.
23. VALERIEVA A, NEDEVA D, YORDANOVA V, et al. Therapeutic management of hereditary angioedema: past, present, and future. *Balkan Med J*. 2021; 38: 89-103.
24. LONGHURST H, CICARDI M. Hereditary angio-oedema. *Lancet*. 2012; 379: 474-481.
25. BOCK SC, SKRIVER K, NIELSEN E, et al. Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry (Mosc)*. 1986; 25: 4292-4301.
26. PERKINS SJ, SMITH KF, AMATAYAKUL S, et al. Two-domain structure of the native and reactive centre cleaved forms of C1 inhibitor of human complement by neutron scattering. *J Mol Biol*. 1990; 214: 751-763.
27. LOMAS DA, BELORGEY D, MALLYA M, et al. Molecular mousetraps and the serpinopathies. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33: 321-330.
28. BEINROHR L, HARMAT V, DOBO J, et al. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease. *J Biol Chem*. 2007; 282: 21100-21109.
29. UMASUTHAN N, BATHIGE SD, REVATHY KS, et al. A C1 inhibitor ortholog from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): molecular perspectives of a central regulator in terms of its genomic arrangement, transcriptional profiles and anti-protease

- 
- activities of recombinant peptide. *Dev Comp Immunol.* 2014; 42: 197-210.
30. CHESNE S, VILLIERS CL, ARLAUD GJ, et al. Fluid-phase interaction of C1 inhibitor (C1 Inh) and the subcomponents C1r and C1s of the first component of complement, C1. *Biochem J.* 1982; 201: 61-70.
  31. GABORIAUD C, THIELENS NM, GREGORY LA, et al. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol.* 2004; 25: 368-373.
  32. CALIEZI C, WUILLEMIN WA, ZEERLEDER S, et al. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev.* 2000; 52: 91-112.
  33. DAVIS AE 3RD. Hereditary angioedema: a current state-of-the-art review, III: mechanisms of hereditary angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008; 100: S7-12.
  34. DUPONCHEL C, DJENOUHAT K, FREMEAUX-BACCHI V, et al. Functional analysis of splicing mutations and of an exon 2 polymorphic variant of *SERPING1/C1NH*. *Hum Mutat.* 2006; 27: 295-296.
  35. GRÝMOVA T, GRODECKA L, SOUCEK P, et al. *SERPING1* exon 3 splicing variants using alternative acceptor splice sites. *Mol Immunol.* 2019; 107: 91-96.
  36. CARTER PE, DUPONCHEL C, TOSI M, et al. Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. *Eur J Biochem.* 1991; 197: 301-308.
  37. GERMENIS AE, MARGAGLIONE M, PESQUERO JB, et al. International consensus on the use of genetics in the management of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019; 8: 901-911.
  38. FARKAS H, MARTINEZ-SAGUER I, BORK K, et al. International consensus on the diagnosis and management of pediatric patients with hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency. *Allergy.* 2017; 72: 300-313.
  39. QIU T, CHIUCHIOLIO MJ, WHALEY AS, et al. Gene therapy for C1 esterase inhibitor deficiency in a murine model of hereditary angioedema. *Allergy.* 2019; 74: 1081-1089.
  40. PONARD D, GABORIAUD C, CHARIGNON D, et al. *SERPING1* mutation update: mutation spectrum and C1 Inhibitor phenotypes. *Hum Mutat.* 2020; 41: 38-57.
  41. KANG HR, YIM EY, OH SY, et al. Normal C1 inhibitor mRNA expression level in type I hereditary angioedema patients: newly found C1 inhibitor gene mutations. *Allergy.* 2006; 61: 260-264.
  42. COLOBRAN R, PUJOL-BORRELL R, HERNANDEZ-GONZALEZ M, et al. A novel splice site mutation in the *SERPING1* gene leads to haploinsufficiency by complete degradation of the mutant allele mRNA in a case of familial hereditary angioedema. *J Clin Immunol.* 2014; 34: 521-523.
  43. NAKAI K, SAKAMOTO H. Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes. *Gene.* 1994; 141: 171-177.
  44. MUCAKI EJ, SHIRLEY BC, ROGAN PK. Prediction of mutant mRNA splice isoforms by information theory-based exon definition. *Hum Mutat.* 2013; 34: 557-565.
  45. SIDDIQUE Z, MCPHADEN AR, LAPPIN DF, et al. An RNA splice site mutation in the C1-inhibitor gene causes type I hereditary angio-oedema. *Hum Genet.* 1991; 88: 231-232.
  46. AABOM A, ANDERSEN KE, FAGERBERG C, et al. Clinical characteristics and real-life diagnostic approaches in all Danish children with hereditary angioedema. *Orphanet J Rare Dis.* 2017; 12: 55.
  47. BYGUM A, FAGERBERG CR, PONARD D. Mutational spectrum and phenotypes in Danish families with hereditary angioedema because of C1 inhibitor deficiency. *Allergy.* 2011 Jan;66: 76-84.
  48. VERPY E, BIASOTTO M, BRAI M, et al. Exhaustive mutation scanning by fluorescence-assisted mismatch analysis discloses new genotype-phenotype correlations in angiodema. *Am J Hum Genet.* 1996; 59: 308-319.
  49. GÖSSWEIN T, KOCOT A, EMMERT G, et al. Mutational spectrum of the C1INH (*SERPING1*) gene in patients with hereditary angioedema. *Cytogenet Genome Res.* 2008; 121: 181-188.
  50. XIONG HY, ALIPANAHI B, LEE LJ, et al. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science.* 2015; 347: 1254806.
  51. ANDREJEVIC S, KOROSEK P, ŠILAR M, et al. Hereditary Angioedema Due to C1 Inhibitor Deficiency in Serbia: Two Novel Mutations and Evidence of Genotype-Phenotype Association. *PLoS One.* 2015; 10: e0142174.
  52. YAMAMOTO T, HORIUCHI T, MIYAHARA H, et al. Hereditary angioedema in Japan: genetic analysis of 13 unrelated cases. *Am J Med Sci.* 2012; 343: 210-214.
  53. CAGINI N, VERONEZ CL, CONSTANTINO-SILVA RN, et al. New mutations in *SERPING1* gene of Brazilian patients with hereditary angioedema. *Biol Chem.* 2016; 397: 337-344.
  54. PAPPALARDO E, CACCIA S, SUFFRITTI C, et al. Mutation screening of C1 inhibitor gene in 108 unrelated families with hereditary angioedema: functional and structural correlates. *Mol Immunol.* 2008; 45: 3536-3544.
  55. KALMAR L, BORS A, FARKAS H, et al. Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema. *Hum Mutat.* 2003; 22: 498.
  56. ROCHE O, BLANCH A, DUPONCHEL C, et al. Hereditary angioedema: the mutation spectrum of *SERPING1/C1NH* in a large

- 
- Spanish cohort. *Hum Mutat.* 2005; 26: 135-144.
57. SPELETAS M, SZILAGYI Á, CSUKA D, et al. F12-46C/T polymorphism as modifier of the clinical phenotype of hereditary angioedema. *Allergy.* 2015; 70: 1661-1664.
58. GRODECKA L, HUJOVA P, KRAMAREK M, et al. Systematic analysis of splicing defects in selected primary immunodeficiencies-related genes. *Clin Immunol.* 2017; 180: 33-44.
59. COLOBRAN R, LOIS S, DE LA CRUZ X, et al. Identification and characterization of a novel splice site mutation in the *SERPING1* gene in a family with hereditary angioedema. *Clin Immunol.* 2014; 150: 143-148.
60. BOWEN B, HAWK JJ, SIBUNKA S, et al. A review of the reported defects in the human C1 esterase inhibitor gene producing hereditary angioedema including four new mutations. *Clin Immunol.* 2001; 98: 157-163.
61. SEKIJIMA Y, HASHIMOTO T, KAWACHI Y, et al. A novel RNA splice site mutation in the C1 inhibitor gene of a patient with type I hereditary angioedema. *Intern Med.* 2004; 43: 253-255.
62. LOPEZ-LERA A, GARRIDO S, ROCHE O, et al. *SERPING1* mutations in 59 families with hereditary angioedema. *Mol Immunol.* 2011; 49: 18-27.
63. KAWACHI Y, HIBI T, YAMAZAKI S, et al. A novel donor splice site mutation in the C1 inhibitor gene of a patient with type I hereditary angioneurotic edema. *J Invest Dermatol.* 1998; 110: 837-839.
64. LAMOND AI, KONARSKA MM, SHARP PA. A mutational analysis of spliceosome assembly: evidence for splice site collaboration during spliceosome formation. *Genes Dev.* 1987; 1: 532-543.
65. PADGETT RA, GRABOWSKI PJ, KONARSKA MM, et al. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem.* 1986; 55: 1119-1150.
66. SENAPATHY P, SHAPIRO MB, HARRIS NL. Splice junctions, branch points sites and exons: sequence statistics, identification and application to genome projects. *Methods Enzymol.* 1990; 183: 252-278.
67. JOHNSRUD I, KULSETH MA, RØDNINGEN OK, et al. A Nationwide Study of Norwegian Patients with Hereditary Angioedema with C1 Inhibitor Deficiency Identified Six Novel Mutations in *SERPING1*. *PLoS One.* 2015; 10: e0131637.
68. ROCA X, KRAINER AR, EPERON IC. Pick one, but be quick: 5' splice sites and the problems of too many choices. *Genes Dev.* 2013; 27: 129-144.
69. BARALLE D, BARALLE M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet.* 2005; 42: 737-748.
70. OBTULOWICZ K, KSIĄŻEK T, BOGDALI A, et al. Genetic variants of *SERPING1* gene in Polish patients with hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency. *Cent Eur J Immunol.* 2020; 45: 301-309.
71. ABRAMOWICZ A, GOS M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet.* 2018; 59: 253-268.
72. KESIM B, UYGUNER ZO, GELINCIK A, et al. The Turkish Hereditary Angioedema Pilot Study (TURHAPS): the first Turkish series of hereditary angioedema. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; 156: 443-450.
73. SUFFRITTI C, ZANICHELLI A, MAGGIONI L, et al. High-molecular-weight kininogen cleavage correlates with disease states in the bradykinin-mediated angioedema due to hereditary C1-inhibitor deficiency. *Clin Exp Allergy.* 2014; 44: 1503-1514.
74. RODRIGUEZ JA, NARVAEZ CF. First Analysis of *SERPING1* Gene in Patients with Hereditary Angioedema in Colombia Reveals Two Genotypic Variants in a Highly Symptomatic Individual. *J Clin Immunol.* 2018; 38: 294-299.
75. PAGANI F, BARALLE FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet.* 2004; 5: 389-396.
76. HUJOVA P, SOUCEK P, GRODECKA L, et al. Deep Intronic Mutation in *SERPING1* Caused Hereditary Angioedema Through Pseudoexon Activation. *J Clin Immunol.* 2020; 40: 435-446.
77. KÄNSÄKOSKI J, JÄÄSKELÄINEN J, JÄÄSKELÄINEN T, et al. Complete androgen insensitivity syndrome caused by a deep intronic pseudoexon-activating mutation in the androgen receptor gene. *Sci Rep.* 2016; 6: 32819.
78. CSUKA D, SZILÁGYI A, FARKAS H. Hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency-From a genetic point of view. *Hereditary Genet.* 2015; 4: e112.
79. IRIMIA M, ROY SW. Origin of spliceosomal introns and alternative splicing. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6: a016071.
80. BERK AJ. Discovery of RNA splicing and genes in pieces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113: 801-805.
81. KEREN H, LEV-MAOR G, AST G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet.* 2010; 11: 345-355.
82. HARE MP, PALUMBI SR. High intron sequence conservation across three mammalian orders suggests functional constraints. *Mol Biol Evol.* 2003; 20: 969-978.
83. MATTICK JS, GAGEN MJ. The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. *Mol Biol Evol.* 2001; 18: 1611-1630.
84. ROGOZIN IB, WOLF YI, SOROKIN AV, et al. Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Curr Biol.* 2003; 13: 1512-1517.

- 
85. KELLY S, GEORGOMANOLIS T, ZIRKEL A, et al. Splicing of many human genes involves sites embedded within introns. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: 4721-4732.
  86. BRINSTER RL, ALLEN JM, BEHRINGER RR, et al. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 836-840.
  87. STADHOUDERS R, VAN DEN HEUVEL A, KOLOVOS P, et al. Transcription regulation by distal enhancers: who's in the loop? *Transcription.* 2012; 3: 181-186.
  88. BECKER PW, SACILOTTO N, NORNES S, et al. An Intronic Flk1 Enhancer Directs Arterial-Specific Expression via RBPJ-Mediated Venous Repression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36: 1209-1219.
  89. MAXWELL ES, FOURNIER MJ. The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem.* 1995; 64: 897-934.
  90. BLACK DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72: 291-336.
  91. SIBLEY CR, BLAZQUEZ L, ULE J. Lessons from non-canonical splicing. *Nat Rev Genet.* 2016; 17: 407-421.
  92. ROCA X, AKERMAN M, GAUS H, et al. Widespread recognition of 5' splice sites by noncanonical base-pairing to U1 snRNA involving bulged nucleotides. *Genes Dev.* 2012; 26: 1098-1109.
  93. CORVELO A, EYRAS E. Exon creation and establishment in human genes. *Genome Biol.* 2008; 9: R141.
  94. SIRONI M, MENOZZI G, RIVA L, et al. Silencer elements as possible inhibitors of pseudoexon splicing. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 1783-1791.
  95. ZHANG XH, CHASIN LA. Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev.* 2004; 18: 1241-1250.
  96. DREYFUSS G, KIM VN, KATAOKA N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 195-205.
  97. RAMALHO AS, BECK S, PENQUE D, et al. Transcript analysis of the cystic fibrosis splicing mutation 1525-1G>A shows use of multiple alternative splicing sites and suggests a putative role of exonic splicing enhancers. *J Med Genet.* 2003; 40: e88.
  98. DHIR A, BURATTI E. Alternative splicing: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies. *FEBS J.* 2010; 277: 841-855.
  99. POPP MW, MAQUAT LE. Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Annu Rev Genet.* 2013; 47: 139-165.
  100. STERNE-WEILER T, SANFORD JR. Exon identity crisis: disease-causing mutations that disrupt the splicing code. *Genome Biol.* 2014; 15: 201.
  101. BURATTI E, DHIR A, LEWANDOWSKA MA, et al. RNA structure is a key regulatory element in pathological ATM and CFTR pseudoexon inclusion events. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 4369-4383.
  102. GREER K, MIZZI K, RICE E, et al. Pseudoexon activation increases phenotype severity in a Becker muscular dystrophy patient. *Mol Genet Genomic Med.* 2015; 3: 320-326.
  103. HARLAND M, MISTRY S, BISHOP DT, et al. A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. *Hum Mol Genet.* 2001; 10: 2679-2686.
  104. EDERY P, MARCAILLOU C, SAHBATOU M, et al. Association of TALS developmental disorder with defect in minor splicing component U4atac snRNA. *Science.* 2011; 332: 240-243.
  105. HE H, LIYANARACHCHI S, AKAGI K, et al. Mutations in U4atac snRNA, a component of the minor spliceosome, in the developmental disorder MOPD I. *Science.* 2011; 332: 238-240.
  106. CAMINSKY N, MUCAKI EJ, ROGAN PK. Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis. *F1000Res.* 2014; 3: 282.
  107. WARD AJ, COOPER TA. The pathobiology of splicing. *J Pathol.* 2010; 220: 152-163.
  108. LE HIR H, IZAURRALDE E, MAQUAT LE, et al. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* 2000; 19: 6860-6869.
  109. MAQUAT LE, LI X. Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA.* 2001; 7: 445-456.
  110. LE HIR H, GATFIELD D, IZAURRALDE E, et al. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 2001; 20: 4987-4997.
  111. GEHRING NH, NEU-YILIK G, SCHELL T, et al. Y14 and hUPF3b form an NMD-activating complex. *Mol Cell.* 2003; 11: 939-949.
  112. STECKELBERG A, BOEHM V, GROMADZKA AM, et al. CWC22 connects pre-mRNA splicing and exon junction complex assembly. *Cell Rep.* 2012; 2: 454-461.
  113. SINGH G, JAKOB S, KLEEDEHN MG, et al. Communication with the exon-junction complex and activation of nonsense-mediated decay by human Upf proteins occur in the cytoplasm. *Mol Cell.* 2007; 27: 780-792.
  114. SINGH G, REBBAPRAGADA I, LYKKE-ANDERSEN J. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex

- 
- recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* 2008; 6: e111.
115. OHNISHI T, YAMASHITA A, KASHIMA I, et al. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol Cell.* 2003; 12: 1187-1200.
116. LEJEUNE F, LI X, MAQUAT LE. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol Cell.* 2003; 12: 675-687.
117. COULLET P, GRANGE T. Premature termination codons enhance mRNA decapping in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: 488-494.
118. HOGG JR, GOFF SP. UPF1 senses 3' UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell.* 2010; 143: 379-389.
119. AMRANI N, GANESAN R, KERVESTIN S, et al. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature.* 2004; 432: 112-118.
120. DOMA MK, PARKER R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature.* 2006; 440: 561-564.
121. CHEN L, MUHLRAD D, HAURYLIUK V, et al. Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nat Struct Mol Biol.* 2010; 17: 1233-1240.
122. TSUBOI T, KUROHA K, KUDO K, et al. Dom34: hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol Cell.* 2012; 46: 518-529.
123. SIMMS CL, THOMAS EN, ZAHER HS. Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017; 8: 10.1002/wrna.1366.
124. CHIABUDINI M, TAIS A, ZHANG Y, et al. Release factor eRF3 mediates premature translation termination on polylysine-stalled ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2014; 34: 4062-4076.
125. WARIN RP, CUNLIFFE WJ, GREAVES MW, et al. Recurrent angioedema: familial and oestrogen-induced. *Br J Dermatol.* 1986; 115: 731-734.
126. BORK K, BARNSTEDT S, KOCH P, et al. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet.* 2000; 356: 213-217.
127. BINKLEY K, DAVIS AE III. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: 546-550.
128. ROYLE NJ, NIGLI M, COOL D, et al. Structural gene encoding human factor XII is located at 5q33-qter. *Somat Cell Mol Genet.* 1988; 14: 217-221.
129. COOL DE, EDGELL CJ, LOUIE GV, et al. Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. Prediction of the primary structure of factor XII and the tertiary structure of beta-factor XIIa. *J Biol Chem.* 1985; 260: 13666-13676.
130. MAAS C, GOVERS-RIEMSLAG JW, BOUMA B, et al. Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3208-3218.
131. SCHMAIER AH. The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3006-3009.
132. STAVROU E, SCHMAIER AH. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res.* 2010; 125: 210-215.
133. DEWALD G, BORK K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 343: 1286-1289.
134. CICHON S, MARTIN L, HENNIES HC, et al. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet.* 2006; 79: 1098-1104.
135. CITARELLA F, RAVON DM, PASCUCCI B, et al. Structure/function analysis of human factor XII using recombinant deletion mutants. Evidence for an additional region involved in the binding to negatively charged surfaces. *Eur J Biochem.* 1996; 238: 240-249.
136. BORK K, WULFF K, MEINKE P, et al. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clin Immunol.* 2011; 141: 31-35.
137. BORK K, WULFF K, HARDT J, et al. Characterization of a partial exon 9/intron 9 deletion in the coagulation factor XII gene (*F12*) detected in two Turkish families with hereditary angioedema and normal C1 inhibitor. *Haemophilia.* 2014; 20: e372-5.
138. VERONEZ CL, SERPA FS, PESQUERO JB. A rare mutation in the *F12* gene in a patient with ACE inhibitor-induced angioedema. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017; 118: 743-745.
139. KISS N, BARABAS E, VARNAI K, et al. Novel duplication in the *F12* gene in a patient with recurrent angioedema. *Clin Immunol.* 2013; 149: 142-145.
140. CICARDI M, BORK K, CABALLERO T, et al. Evidence-based recommendations for the therapeutic management of angioedema owing to hereditary C1 inhibitor deficiency: consensus report of an International Working Group. *Allergy.* 2012; 67: 147-157.
141. ZURAW BL, BORK K, BINKLEY KE, et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor function: consensus of an

- 
- international expert panel. *Allergy Asthma Proc.* 2012; 33 Suppl 1: S145-56.
142. CABALLERO T, CANABAL J, RIVERO-PAPARONI D, et al. Management of hereditary angioedema in pregnant women: a review. *Int J Womens Health.* 2014; 6: 839-848.
143. PIÑERO-SAAVEDRA M, GONZALEZ-QUEVEDO T, SAENZ DE SAN PEDRO B, et al. Hereditary angioedema with *F12* mutation: Clinical features and enzyme polymorphisms in 9 Southwestern Spanish families. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016; 117: 520-526.
144. GOMEZ-TRASEIRA C, LOPEZ-LERA A, DROUET C, et al. Hereditary angioedema caused by the p.Thr309Lys mutation in the *F12* gene: a multifactorial disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 132: 986-989.e1-5.
145. MARCOS C, LOPEZ LERA A, VARELA S, et al. Clinical, biochemical, and genetic characterization of type III hereditary angioedema in 13 Northwest Spanish families. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012; 109: 195-200.
146. PRIETO A, TORNERO P, RUBIO M, et al. Missense mutation Thr309Lys in the coagulation factor XII gene in a Spanish family with hereditary angioedema type III. *Allergy.* 2009; 64: 284-286.
147. CHARIGNON D, GHANNAM A, DEFENDI F, et al. Hereditary angioedema with *F12* mutation: factors modifying the clinical phenotype. *Allergy.* 2014; 69: 1659-1665.
148. FIRINU D, BAFUNNO V, VECCHIONE G, et al. Characterization of patients with angioedema without wheals: the importance of *F12* gene screening. *Clin Immunol.* 2015; 157: 239-248.
149. DUAN QL, BINKLEY K, ROULEAU GA. Genetic analysis of Factor XII and bradykinin catabolic enzymes in a family with estrogen-dependent inherited angioedema. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123: 906-910.
150. NAGY N, GREAVES MW, TANAKA A, et al. Recurrent European missense mutation in the *F12* gene in a British family with type III hereditary angioedema. *J Dermatol Sci.* 2009; 56: 62-64.
151. BOVA M, SUFFRITTI C, BAFUNNO V, et al. Impaired control of the contact system in hereditary angioedema with normal C1-inhibitor. *Allergy.* 2020; 75: 1394-1403.
152. MANSI M, ZANICHELLI A, COEREZZA A, et al. Presentation, diagnosis and treatment of angioedema without wheals: a retrospective analysis of a cohort of 1058 patients. *J Intern Med.* 2015; 277: 585-593.
153. MARTIN L, RAISON-PEYRON N, NÖTHEN MM, et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor gene in a family with affected women and men is associated with the p.Thr328Lys mutation in the *F12* gene. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120: 975-977.
154. VITRAT-HINCKY V, GOMPEL A, DUMESTRE-PERARD C, et al. Type III hereditary angioedema: clinical and biological features in a French cohort. *Allergy.* 2010; 65: 1331-1336.
155. DEROUX A, BOCCON-GIBOD I, FAIN O, et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor and factor XII mutation: a series of 57 patients from the French National Center of Reference for Angioedema. *Clin Exp Immunol.* 2016; 185: 332-337.
156. HENTGES F, HILGER C, KOHNEN M, et al. Angioedema and estrogen-dependent angioedema with activation of the contact system. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123: 262-264.
157. VERONEZ CL, MORENO AS, CONSTANTINO-SILVA RN, et al. Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor and *F12* Mutations in 42 Brazilian Families. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018; 6: 1209-1216.e8.
158. MORENO AS, MAIA LS, PALHAS PB, et al. Genetic Analysis as a Practical Tool for Diagnosis of Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor: A Case Report. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2016; 26: 57-59.
159. STIEBER C, GRUMACH AS, CORDEIRO E, et al. First report of a FXII gene mutation in a Brazilian family with hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Br J Dermatol.* 2015; 173: 1102-1104.
160. GRUMACH AS, STIEBER C, VERONEZ CL, et al. Homozygosity for a factor XII mutation in one female and one male patient with hereditary angio-edema. *Allergy.* 2016; 71: 119-123.
161. MORENO AS, VALLE SO, LEVY S, et al. Coagulation Factor XII Gene Mutation in Brazilian Families with Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015; 166: 114-120.
162. BELL CG, KWAN E, NOLAN RC, et al. First molecular confirmation of an Australian case of type III hereditary angioedema. *Pathology.* 2008; 40: 82-83.
163. BAEZA ML, RODRIGUEZ-MARCO A, PRIETO A, et al. Factor XII gene missense mutation Thr328Lys in an Arab family with hereditary angioedema type III. *Allergy.* 2011; 66: 981-982.
164. PICONE O, DONNADIEU AC, BRIVET FG, et al. Obstetrical complications and outcome in two families with hereditary angioedema due to mutation in the *F12* gene. *Obstet Gynecol Int.* 2010: 957507.
165. PENA SD, DI PIETRO G, FUCHSHUBER-MORAES M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011; 6: e17063.
166. GELINCİK A, DEMİR S, OLGAC M, et al. Idiopathic angioedema with *F12* mutation: is it a new entity? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2015; 114: 154-156.
167. HOFMAN ZLM, CLARK CC, SANRATTANA W, et al. A mutation in the kringle domain of human factor XII that causes

- 
- autoinflammation, disturbs zymogen quiescence, and accelerates activation. *J Biol Chem*. 2020; 295: 363-374.
168. KANAJI T, OKAMURA T, OSAKI K, et al. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood*. 1998; 91: 2010-2014.
169. ARDISSINO D, MANNUCCI PM, MERLINI PA, et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood*. 1999; 94: 46-51.
170. KOHLER HP, FUTERS TS, GRANT PJ. FXII (46C->T) polymorphism and *in vivo* generation of FXII activity-gene frequencies and relationship in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 1999; 81: 745-747.
171. ISHII K, OGUCHI S, MURATA M, et al. Activated factor XII levels are dependent on factor XII 46C/T genotypes and factor XII zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2000; 11: 277-284.
172. ENDLER G, MANNHALTER C, SUNDER-PLOSSMANN H, et al. Homozygosity for the C->T polymorphism at nucleotide 46 in the 5' untranslated region of the factor XII gene protects from development of acute coronary syndrome. *Br J Haematol*. 2001; 115: 1007-1009.
173. ROLDAN V, CORRAL J, MARIN F, et al. Synergistic association between hypercholesterolemia and the C46T factor XII polymorphism for developing premature myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2005; 94: 1294-1299.
174. BACH J, ENDLER G, WINKELMANN BR, et al. Coagulation factor XII (FXII) activity, activated FXII, distribution of FXII C46T gene polymorphism and coronary risk. *J Thromb Haemost*. 2008; 6: 291-296.
175. CORVILLO F, DE LA MORENA-BARRIO ME, MARCOS-BRAVO C, et al. The FXII c.-4T>C Polymorphism as a Disease Modifier in Patients with Hereditary Angioedema Due to the FXII p.Thr328Lys Variant. *Front Genet*. 2020; 11: 1033.
176. RIJAVEC M, KOSNIK M, ANDREJEVIC S, et al. The functional promoter F12-46C/T variant predicts the asymptomatic phenotype of C1-INH-HAE. *Clin Exp Allergy*. 2019; 49: 1520-1522.
177. GIANNI P, LOULES G, ZAMANAKOU M, et al. Genetic Determinants of C1 Inhibitor Deficiency Angioedema Age of Onset. *Int Arch Allergy Immunol*. 2017; 174: 200-204.
178. BORK K, KLEIST R, HARDT J, et al. Kallikrein-kinin system and fibrinolysis in hereditary angioedema due to factor XII gene mutation Thr309Lys. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009; 20: 325-332.
179. BOUILLET L, BOCCON-GIBOD I, PONARD D, et al. Bradykinin receptor 2 antagonist (icatibant) for hereditary angioedema type III attacks. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009; 103: 448.
180. DE MAAT S, DE GROOT PG, MAAS C. Contact system activation on endothelial cells. *Semin Thromb Hemost*. 2014; 40: 887-894.
181. DE MAAT S, BJORKQVIST J, SUFFRITTI C, et al. Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 138: 1414-1423.e1419.
182. JOSEPH K, THOLANIKUNNEL BG, WOLF B, et al. Deficiency of plasminogen activator inhibitor 2 in plasma of patients with hereditary angioedema with normal C1 inhibitor levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 137: 1822-1829.
183. BORK K. Diagnosis and treatment of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010; 6: 15.
184. KLEIN-HITPASS L, TSAI SY, GREENE GL, et al. Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element. *Mol Cell Biol*. 1989; 9: 43-49.
185. FARSETTI A, MISITI S, CITARELLA F, et al. Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression. *Endocrinology*. 1995; 136: 5076-5083.
186. PROUD D, KAPLAN AP. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu Rev Immunol*. 1988; 6: 49-83.
187. NUSSBERGER J, CUGNO M, CICARDI M. Bradykinin-mediated angioedema. *N Engl J Med*. 2002; 347: 621-622.
188. GHANNAM A, DEFENDI F, CHARIGNON D, et al. Contact system activation in patients with HAE and normal C1 inhibitor function. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2013; 33: 513-533.
189. KAPLAN AP, JOSEPH K. Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway. *Adv Immunol*. 2014; 121: 41-89.
190. RIGAT B, HUBERT C, CORVOL P, et al. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res*. 1992; 20: 1433.
191. ZUBERBIER T, ABERER W, ASERO R, et al. The EAACI/GA(2) LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: the 2013 revision and update. *Allergy*. 2014; 69: 868-887.
192. SERRANO C, GUILARTE M, TELLA R, et al. Oestrogen-dependent hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: description of six new cases and review of pathogenic mechanisms and treatment. *Allergy*. 2008; 63: 735-741.
193. MARTIN L, DEGENNE D, TOUTAIN A, et al. Hereditary angioedema type III: an additional French pedigree with autosomal dominant transmission. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107: 747-748.



- 
194. HERRMANN G, SCHNEIDER L, KRIEG T, et al. Efficacy of danazol treatment in a patient with the new variant of hereditary angio-edema (HAE III). *Br J Dermatol*. 2004; 150: 157-158.
  195. BOUILLET L, PONARD D, DROUET C, et al. Angioedema and oral contraception. *Dermatology*. 2003; 206: 106-109.
  196. SHERRY ST, WARD M-H, KHOLODOV M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29: 308e11.
  197. REESE MG, EECKMAN FH, KULP D, et al. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*. 1997; 4: 311e23.
  198. BRUNAK S, ENGELBRECHT J, KNUDSEN S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol*. 1991; 220: 49e6.
  199. WANG M, MARIN A. Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene*. 2006; 366: 219e27.
  200. DESMET FO, HAMROUN D, LALANDE M, et al. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. 2009;37: e67.
  201. [www.umd.be/HSF/HSF.shtml](http://www.umd.be/HSF/HSF.shtml)
  202. KIRCHER M, WITTEN DM, JAIN P, et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014; 46: 310e5.
  203. GELFMAN S, WANG Q, MCSWEENEY KM, et al. Annotating pathogenic non-coding variants in genic regions. *Nat Commun*. 2017; 8: 236.
  204. QUANG D, CHEN Y, XIE X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics*. 2015; 31: 761e3.
  205. COOPER GM, STONE EA, ASIMENOS G, et al. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res*. 2005; 15: 901e13.
  206. PIVA F, GIULIETTI M, BURINI AB, et al. SpliceAid 2: a database of human splicing factors expression data and RNA target motifs. *Hum Mutat*. 2012; 33: 81e5.
  207. [http://193.206.120.249/splicing\\_tissue.html](http://193.206.120.249/splicing_tissue.html)
  208. [www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)
  209. [www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/)
  210. [wangcomputing.com/assp/](http://wangcomputing.com/assp/)
  211. [www.softberry.com/berry.phtml?topic%fssplice&group%programs&subgroup%gfind](http://www.softberry.com/berry.phtml?topic%fssplice&group%programs&subgroup%gfind)
  212. [cadd.gs.washington.edu](http://cadd.gs.washington.edu)
  213. <http://trap-score.org/Search?version%v2>
  214. ARIGA T, IGARASHI T, RAMESH N, et al. Type I C1 inhibitor deficiency with a small messenger RNA resulting from deletion of one exon. *J Clin Invest*. 1989; 83: 1888e93.
  215. RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17: 405-424.
  216. LOULES G, ZAMANAKOU M, PARSOPOULOU F, et al. Targeted next-generation sequencing for the molecular diagnosis of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Gene*. 2018; 667: 76-82.
  217. SINGHAMATR P, KANJANAPONGKUL S, ROJNUCKARIN P. Molecular analysis of factor XII gene in Thai patients with factor XII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2013; 24: 599-604.
  218. WAGENAAR-BOS IG, HACK CE. Structure and function of C1-inhibitor. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2006; 26: 615-632.
  219. LANDERMAN NS, WEBSTER ME, BECKER EL, et al. Hereditary angioneurotic edema. II. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein. *J Allergy*. 1962; 33: 330-341.
  220. CICARDI M, IGARASHI T, ROSEN FS, et al. Molecular basis for the deficiency of complement 1 inhibitor in type I hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest*. 1987; 79: 698-702.
  221. AULAK KS, CICARDI M, HARRISON RA. Identification of a new P1 residue mutation (444Arg-664 Ser) in a dysfunctional C1 inhibitor protein contained in a type II hereditary angioedema plasma. *FEBS Lett*. 1990; 266: 13-16.
  222. SKRIVER K, RADZIEJEWSKA E, SILBERMANN JA, et al. CpG mutations in the reactive site of human C1 inhibitor. *J Biol Chem*. 1989; 264: 3066-3071.
  223. CROWDER JR, CROWDER TR. Five generations of angioneurotic edema. *Arch Int Med*. 1917; 20: 840.
  224. GERMENIS AE, RIJAVEC M, VERONEZ CL. Leveraging Genetics for Hereditary Angioedema: A Road Map to Precision Medicine. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021; Epub ahead of print.
  225. STEINER UC, KELLER M, SCHMID P, et al. Mutational spectrum of the *SERPING1* gene in Swiss patients with hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol*. 2017; 188: 430-436.
  226. BAFUNNO V, BOVA M, LOFFREDO S, et al. Mutational spectrum of the c1 inhibitor gene in a cohort of Italian patients with hereditary angioedema: description of nine novel mutations. *Ann Hum Genet*. 2014; 78: 73-82.
  227. XU YY, ZHI YX, YIN J, et al. Mutational spectrum and geno-phenotype correlation in Chinese families with hereditary

- 
- angioedema. *Allergy*. 2012; 67: 1430-1436.
228. MARTINEZ-PIZARRO A, DEMBIC M, PEREZ B, et al. Intronic PAH gene mutations cause a splicing defect by a novel mechanism involving U1snRNP binding downstream of the 5' splice site. *PLoS Genet*. 2018; 14: e1007360.
229. SINGH G, COOPER TA. Minigene reporter for identification and analysis of cis elements and trans factors affecting pre-mRNA splicing. *Biotechniques*. 2006; 41: 177-181.
230. SHARMA N, SOSNAY PR, RAMALHO AS, et al. Experimental assessment of splicing variants using expression minigenes and comparison with *in silico* predictions. *Hum Mutat*. 2014; 35: 1249-1259.
231. BURATTI E, BARALLE M, BARALLE FE. From single splicing events to thousands: the ambiguous step forward in splicing research. *Brief Funct Genomics*. 2013; 12: 3-12.
232. KALMAR L, HEGEDÜS T, FARKAS H, et al. HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Hum Mutat*. 2005; 25: 1-5.
233. LANDRUM MJ, LEE JM, BENSON M, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: D862-868.
234. VATSIOU S, ZAMANAKOU M, PARSOPOULOU F, et al. The silo effect in the annotation of *SERPING1* variation. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2019; 15(Suppl 4): 45.
235. REHM HL, BERG JS, BROOKS LD, et al. ClinGen--the Clinical Genome Resource. *N Engl J Med*. 2015; 372: 2235-2242.
236. KOZAK M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. 2005; 361: 13-37.
237. KOCHETOV AV. Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *Bioessays*. 2008; 30: 683-691.
238. LEWIS BP, GREEN RE, BRENNER SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 189-192.
239. WAGNER EJ, GARCIA-BLANCO MA. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 3281-3288.
240. HAN SP, TANG YH, SMITH R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J*. 2010; 430: 379-392.
241. CACERES JF, KORNBLIHTT AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet*. 2002; 18: 186-193.
242. ZHANG C, LI WH, KRAINER AR, et al. RNA landscape of evolution for optimal exon and intron discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 5797-5802.
243. KOLOVOS P, KNOCH TA, GROSVELD FG, et al. Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. *Epigenetics Chromatin*. 2012; 5: 1.
244. CAPUTI M, ZÄHLER AM. Determination of the RNA binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H/H'/F/2H9 family. *J Biol Chem*. 2001; 276: 43850-43859.
245. KRECIC AM, SWANSON MS. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11: 363-371.
246. MARCUCCI R, BARALLE FE, ROMANO M. Complex splicing control of the human Thrombopoietin gene by intronic G runs. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35: 132-142.
247. MATUNIS MJ, XING J, DREYFUSS G. The hnRNP F protein: unique primary structure, nucleic acid-binding properties, and subcellular localization. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22: 1059-1067.
248. VERALDI KL, ARHIN GK, MARTINCIC K, et al. hnRNP F influences binding of a 64-kilodalton subunit of cleavage stimulation factor to mRNA precursors in mouse B cells. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 1228-1238.
249. WANG Z, ROLISH ME, YEO G, et al. Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell*. 2004; 119: 831-845.
250. XIAO X, WANG Z, JANG M, et al. Splice site strength-dependent activity and genetic buffering by poly-G runs. *Nat Struct Mol Biol*. 2009; 16: 1094-1100.
251. YEO G, BURGE CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol*. 2004; 11: 377-394.
252. YEO G, HOLSTE D, KREIMAN G, et al. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol*. 2004; 5: R74.
253. YEO G, HOON S, VENKATESH B, et al. Variation in sequence and organization of splicing regulatory elements in vertebrate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 15700-15705.
254. PARK SG, HANNENHALLI S, CHOI SS. Conservation in first introns is positively associated with the number of exons within genes and the presence of regulatory epigenetic signals. *BMC Genomics*. 2014; 15: 526.
255. GAFFNEY DJ, KEIGHTLEY PD. Unexpected conserved non-coding DNA blocks in mammals. *Trends Genet*. 2004; 20: 332-337.
256. BIEBERSTEIN NI, CARRILLO OESTERREICH F, STRAUBE K, et al. First exon length controls active chromatin signatures and

- 
- transcription. *Cell Rep.* 2012; 2: 62-68.
257. BRADNAM KR, KORF I. Longer first introns are a general property of eukaryotic gene structure. *PLoS One.* 2008; 3: e3093.
258. WU X, BREWER G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene.* 2012; 500: 10-21.
259. CARTEGNI L, CHEW SL, KRAINER AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* 2002; 3: 285-298.
260. FAUSTINO NA, COOPER TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003; 17: 419-437.
261. GAO K, MASUDA A, MATSUURA T, et al. Human branch point consensus sequence is yUnAy. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36: 2257-2267.
262. RUSKIN B, GREENE JM, GREEN MR. Cryptic branch point activation allows accurate *in vitro* splicing of human beta-globin intron mutants. *Cell.* 1985; 41: 833-844.
263. HORNING H, AEBI M, WEISSMANN C. Effect of mutations at the lariat branch acceptor site on beta-globin pre-mRNA splicing *in vitro*. *Nature.* 1986; 324: 589-591.
264. WIERINGA B, HOFER E, WEISSMANN C. A minimal intron length but no specific internal sequence is required for splicing the large rabbit beta-globin intron. *Cell.* 1984; 37: 915-925.
265. ADEMA GJ, BOVENBERG RA, JANSZ HS, et al. Unusual branch point selection involved in splicing of the alternatively processed Calcitonin/CGRP-I pre-mRNA. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 9513-9526.
266. HOVHANNISYAN RH, CARSTENS RP. A novel intronic cis element, ISE/ISS-3, regulates rat fibroblast growth factor receptor 2 splicing through activation of an upstream exon and repression of a downstream exon containing a noncanonical branch point sequence. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 250-263.
267. STAINS JP, LECANDA F, TOWLER DA, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses transcription from a cytosine/thymidine-rich element in the osteocalcin promoter. *Biochem J.* 2005; 385: 613-623.
268. CAO W, RAZANAU A, FENG D, et al. Control of alternative splicing by forskolin through hnRNP K during neuronal differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 8059-8071.
269. FAN X, XIONG H, WEI J, et al. Cytoplasmic hnRNPK interacts with GSK3 $\beta$  and is essential for the osteoclast differentiation. *Sci Rep.* 2015; 5: 17732.
270. HABELHAH H, SHAH K, HUANG L, et al. ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 325-330.
271. MATLIN AJ, CLARK F, SMITH CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 386-398.
272. POZZOLI U, SIRONI M. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62: 1579-1604.
273. JUMAA H, GUENET JL, NIELSEN PJ. Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 3116-3124.
274. JUMAA H, NIELSEN PJ. The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO J.* 1997; 16: 5077-5085.
275. GALIANA-ARNOUX D, LEJEUNE F, GESNEL MC, et al. The CD44 alternative v9 exon contains a splicing enhancer responsive to the SR proteins 9G8, ASF/SF2, and SRp20. *J Biol Chem.* 2003; 278: 32943-32953.
276. GONÇALVES V, MATOS P, JORDAN P. The beta-catenin/TCF4 pathway modifies alternative splicing through modulation of SRp20 expression. *RNA.* 2008; 14: 2538-2549.
277. DE LA MATA M, KORNBLIHTT AR. RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat Struct Mol Biol.* 2006; 13: 973-980.
278. BEDARD KM, DAIJOGO S, SEMLER BL. A nucleocytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *EMBO J.* 2007; 26: 459-467.
279. CUI M, ALLEN MA, LARSEN A, et al. Genes involved in pre-mRNA 3'-end formation and transcription termination revealed by a lin-15 operon Muv suppressor screen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 16665-16670.
280. SAEKI K, YASUGI E, OKUMA E, et al. Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRp20 as novel downstream effectors of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 289: E419-428.
281. LYABIN DN, ELISEEVA IA, OVCHINNIKOV LP. YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014; 5: 95-110.
282. IVADY G, MADAR L, DZSUDZSAK E, et al. Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system. *BMC Genomics.* 2018; 19: 158.
283. WANG W, HUANG L, MA Q, et al. Homozygous intronic mutation leading to inefficient transcription combined with a novel frameshift mutation in *F13A1* gene causes FXIII deficiency. *J Hum Genet.* 2011; 56: 460-463.
284. BJÖRKQVIST J, DE MAAT S, LEWANDROWSKI U, et al. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. *J Clin Invest.* 2015; 125: 3132-3146.

- 
285. IVANOV I, MATAFONOV A, SUN MF, et al. A mechanism for hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: an inhibitory regulatory role for the factor XII heavy chain. *Blood*. 2019; 133: 1152-1163.
286. JUKEMA BN, DE MAAT S, MAAS C. Processing of Factor XII during Inflammatory Reactions. *Front Med (Lausanne)*. 2016; 3: 52.
287. MATAFONOV A, SARILLA S, SUN MF, et al. Activation of factor XI by products of prothrombin activation. *Blood*. 2011; 118: 437-445.
288. MOHAMMED BM, IVANOV I, MATAFONOV A, et al. Activity of factor XII-Locarno. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018; 2: 168-173.
289. FIRINU D, LOFFREDO S, BOVA M, et al. The role of genetics in the current diagnostic workup of idiopathic non-histaminergic angioedema. *Allergy*. 2019; 74: 810-812.
290. BORK K, WULFF K, WITZKE G, et al. Hereditary angioedema with normal C1-INH with versus without specific *F12* gene mutations. *Allergy*. 2015; 70: 1004-1012.
291. LÄMMLER B, WUILLEMIN WA, HUBER I, et al. Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency—a study on 74 subjects from 14 Swiss families. *Thromb Haemost*. 1991; 65: 117-121.
292. BORS A, CSUKA D, VARGA L, et al. Less severe clinical manifestations in patients with hereditary angioedema with missense C1INH gene mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131: 1708-1711.
293. LIU J, QIN J, BORODOVSKY A, et al. An investigational RNAi therapeutic targeting Factor XII (ALN-F12) for the treatment of hereditary angioedema. *RNA*. 2019; 25: 255-263.
294. COOL DE, MACGILLIVRAY RT. Characterization of the human blood coagulation factor XII gene. Intron/exon gene organization and analysis of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1987; 262: 13662-13673.
295. QUE BG, DAVIE EW. Characterization of a cDNA coding for human factor XII (Hageman factor). *Biochemistry*. 1986; 25: 1525-1528.
296. TRIPODI M, CITARELLA F, GUIDA S, et al. cDNA sequence coding for human coagulation factor XII (Hageman). *Nucleic Acids Res*. 1986; 14: 3146.
297. McMULLEN BA, FUJIKAWA K. Amino acid sequence of the heavy chain of human alpha-factor XIIa (activated Hageman factor). *J Biol Chem*. 1985; 260: 5328-5341.
298. MIYATA T, KAWABATA S, IWANAGA S, et al. Coagulation factor XII (Hageman factor) Washington D.C.: inactive factor XIIa results from Cys-571-Ser substitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86: 8319-8322.
299. GERMENIS AE, CICARDI M. Driving towards Precision Medicine for angioedema without wheals. *J Autoimmun*. 2019; 104: 102312.
300. STARK Z, SCHOFIELD D, MARTYN M, et al. Does genomic sequencing early in the diagnostic trajectory make a difference? A follow-up study of clinical outcomes and cost-effectiveness. *Genet Med*. 2019; 21: 173-180.
301. VERONEZ CL, DA SILVA ED, LIMA TEIXEIRA PV, et al. Genetic analysis of hereditary angioedema in a Brazilian family by targeted next generation sequencing. *Biol Chem*. 2016; 397: 315-322.
302. MARCELINO-RODRIGUEZ I, CALLERO A, MENDOZA-ALVAREZ A, et al. Bradykinin-Mediated Angioedema: An Update of the Genetic Causes and the Impact of Genomics. *Front Genet*. 2019; 10: 900.
303. ZANICHELLI A, LONGHURST HJ, MAURER M, et al. Misdiagnosis trends in patients with hereditary angioedema from the real-world clinical setting. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2016; 117: 394-398.
304. GRIVCEVA-PANOVSKA V, KOSNIK M, KOROSEC P, et al. Hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency in Macedonia: clinical characteristics, novel *SERPING1* mutations and genetic factors modifying the clinical phenotype. *Ann Med*. 2018; 50: 269-276.
305. Cicardi M, Zuraw BL. Angioedema Due to Bradykinin Dysregulation. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018; 6: 1132-1141.
306. KARADZA-LAPIC L, KOROSEC P, ŠILAR M, et al. Frequent life-threatening laryngeal attacks in two Croatian families with hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency harbouring a novel frameshift mutation in *SERPING1*. *Ann Med*. 2016; 48: 485-491.
307. RIJAVEC M, KOROSEC P, ŠILAR M, et al. Hereditary angioedema nationwide study in Slovenia reveals four novel mutations in *SERPING1* gene. *PLoS One*. 2013; 8: e56712.
308. WU MA, PEREGO F, ZANICHELLI A, et al. Angioedema Phenotypes: Disease Expression and Classification. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016; 51: 162-169.
309. HEGDE M, FERBER M, MAO R, et al. ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genet Med*. 2014; 16: 101-116.
310. NOVOSELOVA TV, RATH SR, CARPENTER K, et al. NNT pseudoexon activation as a novel mechanism for disease in two siblings with familial glucocorticoid deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015; 100: E350-354.
311. MOISIO A-L, JÄRVINEN H, PELTOMÄKI P. Genetic and clinical characterisation of familial adenomatous polyposis: a

- 
- population-based study. *Gut*. 2002; 50: 845-850.
312. LEE M, ROOS P, SHARMA N, et al. Systematic computational identification of variants that activate exonic and intronic cryptic splice sites. *Am J Hum Genet*. 2017; 100: 751-765.
313. FLANAGAN SE, XIE W, CASWELL R, et al. Next-generation sequencing reveals deep intronic cryptic ABCC8 and HADH splicing founder mutations causing hyperinsulinism by pseudoexon activation. *Am J Hum Genet*. 2013; 92: 131-136.
314. AYGÖREN-PÜRSÜN E, MAGERL M, MAETZEL A, et al. Epidemiology of Bradykinin-mediated angioedema: a systematic investigation of epidemiological studies. *Orphanet J Rare Dis*. 2018; 13: 73.
315. STENSON PD, MORT M, BALL EV, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet*. 2017; 136: 665-677.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

---

---

**Πίνακας 17:** Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη.

Μηχανήματα	Όνομα μηχανήματος	Κατασκευάστρια εταιρεία	Αριθμός Καταλόγου
Μηχάνημα εξαγωγής DNA	DNA extractor, iprep	Thermo Scientific	0809D0094
Φωτόμετρο	Spectrophotometer Genova Plus	Jenway	51856
Φθοριόμετρο Qubit® 2.0	Qubit Fluorometer 2.0	Life Technologies	2286613946
Φθοριόμετρο Qubit® 4.0	Qubit Fluorometer 4.0	Life Technologies	2322619099876
Θερμοκυκλοποιητής	Thermal Cycler Veriti FAST	Life Technologies	299010546
Θερμοκυκλοποιητής	Thermal Cycler Veriti	Life Technologies	299026165
Μαγνήτης	96well magnetic separator	Invitrogen	CS15096
Περιστροφικός αναδευτήρας πιάτου	Plate orbital shaker	Eppendorf	5353AH710086
Αναδευτήρα	Vortex GVLab	Gilson	01.438505
Φυγόκεντρος	Centrifuge CL40	Thermo Scientific	41011433
Μικροφυγόκεντρος	MicroCL21R	Thermo Scientific	40979526
Μηχάνημα UV	UV-Transilluminator	UST-20S-8E	UV015080832/0908-677
Μηχάνημα ηλεκτροφόρησης	Electrophoresis power supply and tank	EC300 XL	CI596120314205
Γενετικός αναλυτής	Genetic Analyser ABI3730xl	Life Technologies	1414-002
Γενετικός αναλυτής	Genetic Analyser ABI3730	Life Technologies	21144-016
Θερμικό Μπλοκ ρυθμισμένου στους 50°C	Heat block set to 50°C	MEDINGEN	8353104
Ζυγός	Scale	EMB500-1	WD110041724
Σύστημα καθαρισμού του νερού	Smart 2 Pure	Thermo Scientific	41634720
Ion Rerorter server system	Ion Rerorter server system	Thermo Scientific	743V8N2
Ion Chef	Ion Chef	Life Technologies	242470092
Ion S5 XL System	Ion S5 XL System	Life Technologies	2772817010125
Μηχάνημα Ion OneTouch™ 2	Ion One Touch 2	Life Technologies	2456428-2251
Ion OneTouch™ ES	Ion One Touch ES	Life Technologies	65721
Μηχάνημα Ion PGM™	Ion Torrent PGM	Life Technologies	274670120
Μικροφυγόκεντρος για Ion PGM™ Chip	Ion PGM™ Chip Minifuge	Life Technologies	1309 1266

**Πίνακας 18:** Μετρητικός εξοπλισμός ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στη διεκπεραίωση της μελέτης.

<b>Μετρητικός εξοπλισμός</b>	<b>Όνομα προϊόντος</b>	<b>Κατασκευάστρια εταιρεία</b>	<b>Αριθμός Καταλόγου</b>
Βαθμονομημένη πιπέτα 1-10 μl	Pipetman P10	Gilson	F144802
Βαθμονομημένη πιπέτα 2-20 μl	Pipetman P20	Gilson	F123600
Βαθμονομημένη πιπέτα 10-100 μl	Pipetman P100	Gilson	F123615
Βαθμονομημένη πιπέτα 20-200 μl	Pipetman P200	Gilson	F123601
Βαθμονομημένη πιπέτα 100-1000 μl	Pipetman P1000	Gilson	F123602
Βαθμονομημένη πολυκάναλη πιπέτα 2-20 μl	Pipetman P8x20	Gilson	F14401
Βαθμονομημένη πολυκάναλη πιπέτα 20-200 μl	Pipetman P8x200	Gilson	F14403



**Πίνακας 19:** Αναλώσιμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Κατασκευάστρια εταιρεία	Αριθμός Καταλόγου
Ρύγχη πιπέτας 200 μl, μη αποστειρωμένα	TIPS D200	Gilson	F161930
Ρύγχη πιπέτας 10 μl, μη αποστειρωμένα	TIPS DL10	Gilson	F161450
Ρύγχη πιπέτας 1200 μl, με φίλτρο, αποστειρωμένα	TIPS DF1200ST	Gilson	F171803
Ρύγχη πιπέτας 1000 μl, με φίλτρο, αποστειρωμένα	TIPS DF1000ST	Gilson	F171703
Ρύγχη πιπέτας 200 μl, με φίλτρο, αποστειρωμένα	TIPS DF200ST	Gilson	F171503
Ρύγχη πιπέτας 200 μl, αποστειρωμένα	TIPS D200ST	Gilson	F171301
Ρύγχη πιπέτας 100 μl, με φίλτρο, αποστειρωμένα	TIPS DF100ST	Gilson	F171403
Ρύγχη πιπέτας 30 μl, με φίλτρο, αποστειρωμένα	TIPS DF30ST	Gilson	F171303
Ρύγχη πιπέτας 10 μl, με φίλτρο, αποστειρωμένα	TIPS DFL10ST	Gilson	F171203
Μεμβράνη σιλικόνης για αλληλούχηση σε 96-Well Reaction Plate	Plate Septa 96well	Applied Biosystems	4315933
Πλαστική διαφανής μεμβράνη για 96-Well Reaction Plate	MicroAmp Optical Reaction Plate	Applied Biosystems	N8010560
Πλαστική μεμβράνη αλουμινίου για 96-Well Reaction Plate	Aluminium seal tape	Thermo Scientific	232698
Πιάτα PCR αντίδρασης	MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate no Bar-code 10/pkg	Applied Biosystems	N8010560
Φιαλίδιο 5 ml	Eppendorf Tubes Conical 5 ml	Eppendorf	15188344
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1,7mL	Microcentrifuge Tube 1,7 ml	AXYGEN	MCT-175-C
Φιαλίδιο PCR 0,2 ml, αποστειρωμένα	RCR Tubes 0,2 ml with flot cap RNase DNase free	Corning	6571
Φιαλίδιο 0,5 ml	RCR Tubes 0,5 ml	AXYGEN	PCR-05-C
Καπάκια για σειρά οκτώ φιαλιδίων 0,2 ml	FG-optical caps	Applied Biosystems	4323032
Σειρά οκτώ φιαλιδίων 0,2 ml	Microamp 8-strip reaction tubes 0,2 ml	Applied Biosystems	N8010580
Πλαστικές πιπέτες Pasteur	Plastic Pasteurs	BD	357575
Κατάλληλο φιαλίδιο μέτρησης συγκέντρωσης σε φωτόμετρο	Photometer Cuvette X100 UV 70-550 Ml individually packed	BRAND	759235
Γυάλινο δοχείο 250 ml	Beakers Glass 250 ml	FisherBrand	FB33112
Γυάλινο δοχείο 600 ml	Beakers Glass 600 ml	FisherBrand	FB33114
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 50 mL	50 ml centrifuge tube	Thermo Scientific	339652
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 15 mL	15 ml centrifuge tube	Thermo Scientific	339650

**Πίνακας 20:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους.

Αντιδραστήρια	Όνομα προϊόντος	Κατασκευάστρια εταιρεία	Αριθμός Καταλόγου
Κιτ απομόνωσης DNA	iPrep Pure Link DNA blood kit	Invitrogen	IS-10005
Πολυμεράση Taq	DreamTaq DNA Polymerase EA	Thermo Fisher	EP0702
Χλωριούχο μαγνήσιο 50 mM	50mM Magnesium Chloride	Invitrogen	B0300-1VL
Ολιγονουκλεοτίδια	dNTP Set (100 mM)	Thermo	10297018
Μάρτυρας DNA	100 bp DNA Ladder (50 µg)	Invitrogen	15628-019
Αγαρόζη	Agarose	Invitrogen	16500-500
Χρωστική	SYBR® Safe DNA Gel Stain (400 µl)	Invitrogen	S33102
Διάλυμα TAE	10 x TAE Buffer UltraPure	Gibco	15558-042
Κιτ καθαρισμού προϊόντος PCR	Purelink PCR Purification kit	Invitrogen	K310002
Κιτ καθαρισμού προϊόντος PCR	Exosapit	Applied Biosystems	78201.1.ML
Κιτ αλληλούχησης	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	4337457
Ρυθμιστικό διάλυμα του Κιτ αλληλούχησης	BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer	Applied Biosystems	4336699
Betaine	Betaine solution 5 M	Sigma-Aldrich	B0300-1VL
Αιθανόλη 100%	Ethanol Absolute	Scharlau	ET00162500
Φορμαμίδιο	Hi-Di Formamide	Applied Biosystems	4311320
Άνυδρο οξικό νάτριο	Sodium acetate anhydrous	Scharlau	SO00360500
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA	Scharlau	AC09630250
Κιτ μέτρησης συγκέντρωσης στο Qubit	Qubit® dsDNA HS Assay Kits	Life Technologies	Q32854
POP-7™ Πολυμερές για 3730/3730xl DNA Αναλυτές	POP-7 Polymer for 3730/3730xl DNA Analyzers	Applied Biosystems	4335615
Εκκινητές του panel γονιδίων για το HAE	NGS primers HAE	Ion Torrent	IAD92366_241
Κιτ δημιουργίας Βιβλιοθήκης Ion AmpliSeq™ 2.0	Ion Ampliseq Library kit 2.0-96LV	Life Technologies	4480441
Αντιδραστήριο για τον καθαρισμό των αντιδράσεων και την επιλογή μεγεθών	Agencourt® AMPure® XP	Beckman Coulter	A63881
Προσαρμογείς-κωδικοί ιχνηλασιμότητας Ion Xpress™ 1-96 Kit	Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 kit	Thermo Fisher	4474517
Ion PGM Hi-Q Wash 2 Bottle Kit	Ion PGM Hi-Q Wash 2 Bottle Kit	Life Technologies	A25591
Ρυθμιστικό διάλυμα 3730	3730 Buffer 10x with EDTA	Applied Biosystems	4335613
Κιτ βαθμονόμησης PGM	Ion PGM™ Calibration Standard	Life Technologies	A27832

**Πίνακας 20:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και χαρακτηριστικά τους (συνέχεια).

Αντιδραστήρια	Όνομα προϊόντος	Κατασκευάστρια εταιρεία	Αριθμός Καταλόγου
Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit	Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit	Life Technologies	A27739
Κιτ αλληλούχησης NGS	Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit	Life Technologies	A25592
Κιτ αλληλούχησης NGS	Ion 520™ & Ion 530™ ExT Kit-Chef	Thermo Fisher	A30670
Τσιπ 520	Ion 520™ Chip Kit	Thermo Fisher	A27762
Τσιπ 530	Ion 530™ Chip Kit	Thermo Fisher	A27764
Σφαιρίδια εμπλουτισμού	Ion PGM™ Enrichment Beads	Life Technologies	4478525
Τσιπ 318	Ion 318 Chip Kit V2 BC	Life Technologies	4488146
Τσιπ 316	Ion 316 Chip Kit V2 BC	Life Technologies	4488145
Διάλυμα TRI	TRI	Ambion	9783
Φικόλη	Ficoll Histopaque	BIOCHROM	L6115
Διάλυμα PBS	10 x PBS	Gibco	70013-016
Χλωροφόρμιο	Chloroform	Euroclone	EMR 112250
Ισοπροπανόλη	2-propanol	Scharlau	AL03241000
Αντίστροφη Μεταγραφάση	M-MLV Reverse Transcripatase	Invitogen	28025-021
Αναστολέας RNασών	RNase inhibitor, 2,500U, 40 U/μl	Promega	N2111
Εξαμερή ως τυχαίοι εκκινητές	Primer random p[dN]6	Roche	1034731
Σύριγγα 2,5 ml	2,5 ml syringe	-	-
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/ml	Bio Rad	161-0433
Διάλυμα προστασίας από RNάσες	RNaseZap™ RNase Decontamination Solution	Invitrogen	AM9780
Δεξαμενή πεπιεσμένου αζώτου	Tank of compressed nitrogen	Linde	300311-00015908
Γυάλινη φιάλη (1 λίτρο)	Glass bottle (1 L)	-	-
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection sterile bottle 1000 ml	Demo solutions	1205

**Πίνακας 21:** Η εκτίμηση των 29 ιντρονικών μεταλλάξεων με βάση εννέα βιοπληροφορικά εργαλεία. [NI, No impact; NP, Not provided; D, new donor; ISS, Intronic splicing silencer; ISE, Intronic splicing enhancer; ESS, Exonic splicing silencer; ESE, Exonic splicing enhancer].

Coding	NNSPLICE	Netgene2	ASSP	FSPLICE	HSF	CADD	Trap	DANN	GERP
c.51+101G>A	NI	NI	NI	NI	Alteration ESS	7,49	0,01	0,74	0,5159
c.51+625_51+626dupTG	NI	NI	NI	NI	Activation intronic cryptic donor site	NP	NP	NP	-0,6039
c.52-696C>T	NI	NI	NI	NI	Creation ESE	5,53	0,11	0,61	1,4199
c.52-130C>T	NI	NI	NI	NI	Creation ESE	8,87	0,05	0,52	3,7699
c.551-500C>G	NI	NI	NI	NI	Activation intronic cryptic acceptor site/Alteration ESS/Creation ESE	7,52	0,23	0,77	-0,989
c.551-495A>C	NI	NI	NI	NI	Alteration ESS/Creation ESE	8,83	0,10	0,72	3,17
c.551-155A>G	NI	NI	NI	NI	Creation of ESE.	1,42	0,10	0,35	NP
c.685+88G>A	NI	NI	NI	NI	Alteration ESS/Creation ESE	14,85	0,03	0,87	3,68
c.685+1100C>T	D:0,75	NI	NI	D: 8,76	Activation intronic cryptic donor site,	NP	0,63	0,92	NP
c.686-1572G>T	NI	NI	NI	NI	Alteration ESS/ Creation ESE	1,68	0,16	0,66	-0,4609
c.686-1565G>A	NI	NI	NI	NI	Alteration ESS	7,44	0,03	0,65	2,44
c.686-957A>G	NI	NI	NI	NI	Activation intronic cryptic donor site,	2,79	0,04	0,62	0,06689
c.1029+312T>C	NI	NI	NI	NI	Alteration ESS/Creation ESE	8,59	0,02	0,74	0,8529
c.1029+851C>G	NI	NI	NI	NI	Creation ESE	0,66	0,07	0,23	-2,75
c.1029+926G>T	NI	NI	NI	NI	NI	0,29	0,05	0,70	-5
c.1029+1443G>C	NI	NI	NI	NI	NI	0,59	0,25	0,64	-1,09
c.1029+2110T>C	NI	NI	NI	NI	Creation ESE	3,14	0,04	0,42	0,421
c.1029+2111G>A	D:0,75	NI	NI	-	Alteration ESS/ Creation ESE	0,50	0,06	0,23	-0,841
c.1030-1198G>T	NI	NI	NI	NI	Alteration ESS	1,81	0,14	0,53	-1,11
c.1030-1222A>G	NI	NI	NI	NI	NI	0,43	0,09	0,38	-5,51
c.1030-865C>T	NI	NI	NI	NI	NI	0,12	0,02	0,64	-4,4899
c.1030-20A>G	D: 0,73	NI	D:0		NI	4,78	0,20	0,56	0,25
c.1250-538T>C	NI	NI	NI	NI	Alteration ESS/Creation ESE	0,78	0,10	0,5,	-1,5299
c.1250-282T>C	NI	NI	NI	NI	Creation ESE	6,99	0,11	0,81	1,2

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

---

---

## Aspects of hereditary angioedema genotyping in the era of NGS: The case of *F12* gene

### Wybrane aspekty genotypowania wrodzonego obrzęku naczynioruchowego w erze NGS: gen *F12*

SOFIA VATSIU<sup>1,2</sup>, MARIA ZAMANAKOU<sup>1</sup>, GEDEON LOULES<sup>1</sup>, TERESA GONZÁLEZ-QUEVEDO<sup>3</sup>, GRZEGORZ PORĘBSKI<sup>4</sup>, ALDONA JUCHACZ<sup>5</sup>, MARIA BOVA<sup>6</sup>, CHIARA SUFFRITTI<sup>7</sup>, DAVIDE FIRINU<sup>8</sup>, DOROTTYA CSUKA<sup>9</sup>, EMMANOUIL MANOUSAKIS<sup>10</sup>, ANNA VALERIEVA<sup>11</sup>, MARIA STAEVSKA<sup>11</sup>, MARKUS MAGERL<sup>12</sup>, HENRIETTE FARKAS<sup>9</sup>, ANASTASIOS E. GERMENIS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CeMIA SA, Larissa, Greece

<sup>2</sup> Department of Immunology & Histocompatibility, University of Thessaly, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Larissa, Greece

<sup>3</sup> Reference Unit for Angioedema in Andalusia, Allergy Department, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain

<sup>4</sup> Department of Clinical and Environmental Allergology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>5</sup> Centre of Pulmonology and Thoracic Surgery, Poznan, Poland

<sup>6</sup> Department of Translational Medicine, University Federico II, Naples, Italy

<sup>7</sup> Department of Biomedical and Clinical Sciences, University of Milan, Milan, Italy

<sup>8</sup> Department of Medical Sciences and Public Health, University of Cagliari, Cagliari, Italy

<sup>9</sup> Hungarian Angioedema Reference Center, 3rd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>10</sup> Allergy Department, 2nd Pediatric Clinic, University of Athens, Athens, Greece.

<sup>11</sup> Clinical Centre of Allergology, Medical University, Sofia, Bulgaria

<sup>12</sup> Department of Dermatology and Allergy, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany

#### Summary

**Objective.** To screen a cohort of patients diagnosed with non-FXII angioedema for carriage of variants of *F12* gene.

**Material and methods.** DNA samples from 191 patients suffering from primary angioedema with normal C1-INH, 54 samples from non-affected family members, and 161 samples from C1-INH-HAE (154 type I, 7 type II) patients were included in the study. The *F12* gene was genotyped by targeted NGS (100% coverage of translated regions). Sanger sequencing was performed for the verification of all identified variants and family segregation studies.

**Results.** The pathogenic *F12* variant c.983C>A was detected in three patients from two unrelated families initially diagnosed as U-HAE. Six additional mutations were identified, four of which were characterized as benign (c.41T>C, c.418C>G, c.1025C>T, c.530C>T) and two of uncertain significance (c.1530G>C, c.1768T>G). Two synonymous variants (c.756C>T and c.711C>T), the common polymorphism c.619G>C, and the functional polymorphism c.-4T>C were detected in allele frequencies similar to those presented in the ExAC database for the European population. One more not yet reported synonymous variant (c.1599A>G) was also found.

**Conclusion.** Analyzing the entire translated region of *F12* gene is important in order to identify new variants that possibly affect HAE expressivity. Interestingly, genetic analysis of *F12* supports not only the diagnosis of FXII-HAE but also the correct exclusion diagnosis of U-HAE.

**Keywords:** *F12* gene, *F12* mutations, hereditary angioedema, next-generation sequencing

#### Streszczenie

**Cel.** Przesiewowe badanie kohorty pacjentów z rozpoznaniem obrzękiem naczynioruchowym innym niż zależny od FXII w kierunku nosicielstwa wariantów genu *F12*.

**Materiał i metody.** Do badania włączono próbki DNA 191 pacjentów cierpiących na pierwotny obrzęk naczynioruchowy z prawidłowym C1-INH, 54 zdrowych członków rodzin oraz 161 pacjentów z C1-INH-HAE (154 typ I, 7 typ II). Gen *F12* był genotypowany metodą NGS (obejmującą cały region poddany translacji). Sekwencjonowanie metodą Sanger'a zostało wykonane celem weryfikacji wszystkich zidentyfikowanych wariantów i badań segregacyjnych rodzin.

**Wyniki.** U trzech pacjentów z dwóch niespokrewnionych rodzin pierwotnie zdiagnozowanych jako U-HAE wykryto patogenny wariant *F12*: c.983C>A. Zidentyfikowano sześć dodatkowych mutacji, z których cztery zostały określone jako łagodne (c.41T>C, c.418C>G, c.1025C>T, c.530C>T), a dwie jako mutacje o niepewnym znaczeniu (c.1530G>C, c.1768T>G). Stwierdzono dwa warianty synonimiczne (c.756C>T oraz c.711C>T), pospolity polimorfizm (c.619G>C) oraz czynnościowy polimorfizm c.-4T>C z częstością alleliczną podobną do podawanej w bazie ExAC dla populacji europejskiej. Wykryto również jeden nie raportowany dotychczas wariant synonimiczny (c.1599A>G).

**Wnioski.** Analiza całego regionu genu *F12* poddawanego translacji jest ważna dla identyfikowania nowych wariantów, które mogą oddziaływać na ekspresję HAE. Ponadto, analiza genetyczna *F12* pozwala nie tylko na potwierdzenie rozpoznania FXII-HAE, ale również prawidłowe wykluczenie rozpoznania U-HAE.

**Słowa kluczowe:** gen *F12*, mutacje *F12*, wrodzony obrzęk naczynioruchowy, sekwencjonowanie następnej generacji

© Alergia Astma Immunologia 2018, 23 (4): 205-210  
www.alergia-astma-immunologia.pl



#### Adres do korespondencji / Address for correspondence

Prof. Anastasios E. Gemenis  
Department of Immunology & Histocompatibility  
Faculty of Medicine – University of Thessaly  
3, Panepistimiou Street, GR-41500 Biopolis, Larissa, Greece  
tel.: +302410-685718, fax: +302410-685695  
e-mail: agemen@med.uth.gr

#### Abbreviations:

**ACEi-AAE** – acquired angioedema related to angiotensin-converting enzyme inhibitor  
**C1-INH** – C1-inhibitor  
**C1-INH-HAE** – hereditary angioedema due to C1-INH deficiency  
**FXII-HAE** – hereditary angioedema with *F12* mutation  
**HAE** – hereditary angioedema  
**INH-AAE** – idiopathic non-histaminergic acquired angioedema

**ISPs** – enriched template-positive Ion Sphere Particles  
**n-C1-INH-HAE** – hereditary angioedema with normal C1-esterase inhibitor  
**NGS** – next generation sequencing  
**PGM** – personal genome machine  
**U-HAE** – unknown hereditary angioedema  
**VUS** – variant of uncertain significance

#### INTRODUCTION

HAE is a rare and potentially life-threatening genetic disorder, manifested by recurrent attacks of subcutaneous and/or submucosal edemas which develop as a result of transient release of vasoactive peptides and increased permeability of blood vessels [1]. Its pathogenicity, until now, has been associated with mutations in four genes, *SERPING1* [1], *F12* [1], *PLG* [2, 3] and *ANGPT1* [4]. Mutations in *SERPING1* result in deficiencies of C1-INH causing C1-INH-HAE, whereas the other mutations do not affect concentration or function of C1-INH. These types of HAE are called nC1-INH-HAE, regardless if a mutation is known (FXII-HAE, PLG-HAE, ANGPT1-HAE) or not (U-HAE). The conventional analysis of these genes is cumbersome, time consuming, and unable to support parallel investigation of multiple targets. Recent progress in massive parallel sequencing, termed NGS, has increased the speed and efficiency of mutation testing. As NGS overcomes many of the obstacles that have been faced by traditional approaches, we proceeded to the development and validation of a custom NGS platform (NGS-HAE panel) that targets the entire 11q12-q13.1 locus, including the promoter, coding, intron-exon boundary, intronic regions of the *SERPING1* gene [5]. Aiming to examine the possible involvement of other genes in the manifestation of HAE, we expanded this panel by introducing a number of genes encoding for proteins involved in bradykinin metabolism and function, including *F12*.

As it is known, four *F12* pathogenic alterations have been identified, so far: two missense mutations (c.983C>A and c.983C>G) [6], a deletion of 72 bp (c.971\_1018+ 24del72) [7] and a duplication of 18 bp (c.892\_909dup) [8]. Furthermore, the functional promoter polymorphism *F12* c.-4T>C (rs1801020) acts as an independent modifier of C1-INH-HAE severity [9]. Finally, in a recent study a patient bearing two co-existing pathogenic mutations in *SERPING1* and *F12* gene has been described [10].

The aim of this article is to present the data obtained from genotyping a cohort of patients with different types of angioedema using the above mentioned NGS-HAE panel, as far as, the *F12* gene is regarded.

#### MATERIAL AND METHODS

##### Study subjects

A total of 191 DNA samples with normal C1-inhibitor (139 U-HAE, 14 INH-AAE, 3 ACEi-AAE, 8 CPN1 deficiency, 27 samples from patients with recurrent angioedema and normal C1-INH but with unknown family history and not fulfilling the criteria for INH-AAE) belonging to 160 families of European origin (52 Hungarian, 33 Greek, 3 German, 28 Spanish, 8 Polish, 31 Italian, 3 French, 2 Bulgarian) were genotyped along with 54 samples from non-affected family members. Additionally, 161 C1-INH-HAE (154 type I, 7 type II) samples bearing various *SERPING1* pathogenic mutations were screened for the presence of a mutation in *F12* gene. The local institutional review boards approved this study, and written informed consent was obtained from each individual or an accompanying relative.

##### Next-Generation Sequencing

A NGS custom panel was designed using the Ion AmpliSeq Thermo Fisher Scientific Designer, in order to analyze all the exonic, exon-intron junctions and untranslated (5' and 3'-UTR) regions of the *F12* gene. 16 amplicons divided in two primer pools provide 100% coverage of all translated regions of the gene. Additional amplicons (809 in total) for different genes (n=55) selected among those encoding for proteins involved in bradykinin metabolism, including *SERPING1* gene, were introduced to the panel. Amplicon libraries of the *F12* regions were prepared using an Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Scientific) and Ion Xpress™ Barcode Adapter 1-96 Kit (Thermo Scientific). Pooled, barcoded libraries were clonally amplified using the Ion OneTouch™ system and Ion OT2 HI-Q Template kit (Thermo Scientific). ISPs were enriched with the Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (Thermo Scientific) and washed with the Ion OneTouch Wash Solution included in the kit using the Ion One Touch ES system (Thermo Scientific). The subsequently enriched template-positive ISPs were loaded onto Ion 318 chips and sequenced on the PGM using the Ion PGM Hi-Q

sequencing kit (Thermo Scientific). All procedures were performed according to the manufacturer's instructions.

Sequencing raw data were analyzed for base calling, demultiplexing, alignment to hg19 reference genome (GRCh37), coverage analysis and variant calling on Torrent Suite 5.2 software (Ion Torrent) using default parameters. The plugins used for the analysis were CoverageAnalysis v.5.2.1.2 and VariantCaller v.5.2. The reference sequences of *F12* and *SERPING1* genes were NM\_000505.3 and NM\_000062.2, respectively. Annotation of variants was performed on Ion Reporter software v.5.2 (Thermo Scientific). PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) bioinformatic tools were used to predict the effect of amino acid substitution. The integrative genomics viewer v2.2 (IGV, Broad Institute) was used for visualization.

Sanger sequencing was performed for the verification of all identified variants and family segregation studies, as previously described [11].

## RESULTS

All variants detected in the *F12* gene are presented in Figure 1, while their allele frequencies are shown in Table I.

The missense pathogenic mutation c.983C>A (p.Thr328Lys, rs118204456) of the *F12* gene was identified in three subjects, belonging to two unrelated Spanish families, initially diagnosed with U-HAE.

Beyond this, six *F12* missense mutations were found in our patients (Fig. 1). In two different patients with type I C1-INH-HAE the mutations c.41T>C (p.Leu14Ser, rs143809932) and c.1025C>T (p.Pro342Leu, rs2230939) were detected. The mutation c.418C>G (p.Leu140Val, rs35515200) was detected in one German patient with type I C1-INH-HAE and in two patients with U-HAE, one of Italian and the oth-

er of Polish origin. The mutation c.530C>T (p.Ala177Val, rs144821595) was detected in two U-HAE patients, while the c.1768T>G (p.Cys590Gly) and the c.1530G>C (p.Glu510Asp) were detected in two different patients with normal C1-INH.

Carriers of combined *SERPING1* and *F12* pathogenic mutations were not detected.

Two common synonymous mutations were identified (c.756C>T, rs41309752 and c.711C>T, rs17876047) and their allele frequencies in individuals of European origin are 0.97% and 4.02% respectively (ExAC database). Additionally, one rare synonymous mutation (c.1599A>G), not published in NCBI and ExAC databases, was detected in a single U-HAE patient of Hungarian origin.

Finally, the common *F12* polymorphism rs17876030 (c.619G>C, p.Ala207Pro, exon 7) was detected in 11 samples (5 C1-INH-HAE, 6 nC1-INH-HAE) while the functional promoter polymorphism *F12* c.-4T>C (rs1801020) was detected in 73 samples (13 homozygous) with normal C1-INH belonging to 60 families and 52 samples with C1-INH-HAE (9 homozygous).

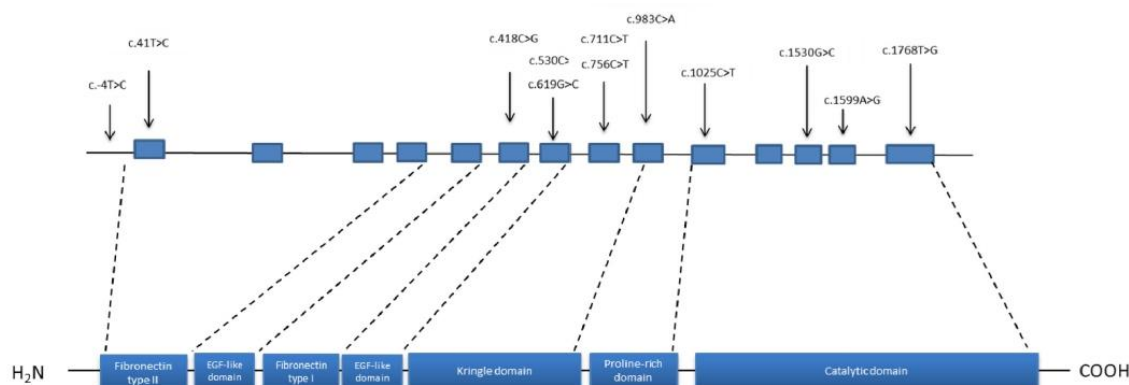
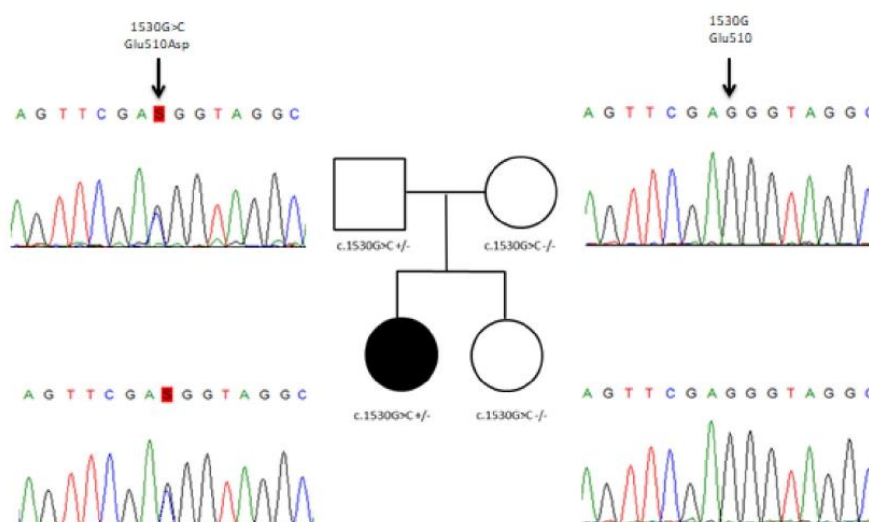
## DISCUSSION

Approximately 25% of angioedema cases with normal C1-INH are associated with a mutation in the *F12* gene [12]. The mutations described until now as causative for FXII-HAE are located in exon 9 of the *F12* gene. The majority of patients bear the c.983C>A substitution which results in a threonine-to-lysine aminoacid change (p.Thr328Lys) in factor XII [12]. Another mutation predicting a threonine-to-arginine substitution (c.983C>G, p.Thr328Arg) in the same codon has been described in two German families [6]. There has also been a report of an 18-bp duplication (c.892\_909dup) in a Hungarian family and a 72-bp deletion (c.971\_1018 + 24del72) in a Turkish family [7, 8]. All these

Table I. The allele frequencies of all mutations

F12 alteration			Allele frequencies		
Exon	Characterization of mutation	Nucleotide	ExAC (EU)	nC1-INH-HAE (n=160)	C1-INH-HAE (n=161)
utr_5	Functional Polymorphism	c.-4T>C	24.02%	60 (22.81%)	52 (18.94%)
Exon 1	Likely Benign	c.41T>C	0.01%	0 (<0.001%)	1 (0.31%)
Exon 6	Benign	c.418C>G	0.32%	2 (0.62%)	1 (0.31%)
Exon 7	Benign	c.530C>T	0.01%	2 (0.62%)	0 (<0.001%)
Exon 7	Polymorphism	c.619G>C	1.38%	6 (2.5%)	5 (1.55%)
Exon 8	Synonymous	c.711C>T	4.02%	8 (2.5%)	6 (1.86%)
Exon 8	Synonymous	c.756C>T	0.97%	4 (1.25%)	5 (1.55%)
Exon 9	Pathogenic	c.983C>A	<0.001%	2 (0.62%)	0 (<0.001%)
Exon 10	Benign	c.1025C>T	0.11%	0 (<0.001%)	1 (0.31%)
Exon 12	VUS	c.1530G>C	<0.001%	1 (0.31%)	0 (<0.001%)
Exon 13	Synonymous	c.1599A>G	<0.001%	1 (0.31%)	0 (<0.001%)
Exon 14	VUS	c.1768T>G	<0.001%	1 (0.31%)	0 (<0.001%)



Fig. 1. Detected mutations in the *F12* geneFig. 2. Family segregation study for the c.1530G>C (p.Glu510Asp) in the *F12* gene

mutations are located in the proline-rich linker peptide between the Kringle and trypsin-like serine protease (Tryp-SPc) domains of the FXII protein.

The mechanism of function of FXII-HAE is not fully understood. It has been proposed that the p.Thr328Lys increases enzymatic plasma activity in female mutation carriers that leads to enhanced kinin production resulting in angioedema [13]. Contrary to this study, Bork et al. have shown that there is no difference between FXII-HAE patients bearing the p.Thr328Lys mutation and their healthy probands in regard to FXII surface activation concluding that the mutation does not cause a 'gain-of-function' of FXIIa [14]. Subsequent *in vivo* and *in vitro* experiments in mice suggest that p.Thr328Lys and p.Thr328Arg result to the loss of O-linked glycosylation [15]. As a result, the proline-rich region is less negatively charged and the overall protein size of the mutant FXII molecule is reduced causing an increase in the susceptibility of FXII zymogen auto-activation that leads to excessive activation of bradykinin formation through the kallikrein-kinin pathway [16]. Furthermore, these mutations lead in accelerated activation of

the FXII by a plasmin, a natural activator of contact system [17]. However, further investigation is necessary to determine the pathway by which these alterations contribute to the formation of hereditary angioedema.

In this study, the mutation c.983C>A was identified in three women from two unrelated Spanish families initially misdiagnosed as U-HAE. These patients demonstrate features indicative of FXII-HAE in that attacks were appeared either during gestational periods or after the administration of estrogens.

Additionally, we identified six rare or not yet reported mutations in the *F12* gene (c.41T>C, c.418C>G, c.530C>T, c.1025C>T, c.1530G>C, c.1768T>G). The mutation c.41T>C (p.Leu14Ser), located in exon 1 of the *F12* gene, was identified in a single type I C1-INH-HAE Bulgarian patient co-carrying a pathogenic frameshift mutation in *SERPING1* gene. This variant is predicted to be deleterious by SIFT and probably damaging by PolyPhen2 analysis. Unfortunately, family segregation was impossible. Nevertheless, considering that the mutation has been detected in 0.01507% individuals of European origin (ExAC database)

and that its allele frequency is greater than that expected for FXII-HAE and *F12* deficiency, according to ACMG guidelines it is interpreted as likely benign [18].

The c.418C>G (p.Leu140Val) mutation is located in exon 6 of the *F12* gene and was detected in one German patient with type I C1-INH-HAE and two (an Italian and a Polish) U-HAE patients. Bioinformatic analysis by SIFT and PolyPhen2 algorithms predicted this mutation as tolerated and possibly damaging, respectively. The mutation is characterized as likely benign in ClinVar database in association to hereditary angioedema and factor XII deficiency. It has been detected in 0.3283% individuals of European origin and 0.2215% worldwide. Family segregation study performed in the two families of U-HAE revealed the mutation in three healthy family members, a fact supporting its previous characterization as benign.

The alteration c.530C>T (p.Ala177Val) is located in exon 7 of the *F12* gene and was detected in one Spanish and one Italian U-HAE patient. It presents with an allele frequency of 0.01413% and 0.00907% (ExAC database) in the European and worldwide population, respectively, and is predicted to be benign by both SIFT and PolyPhen2 bioinformatic tools. Family segregation in the Italian family supported that this alteration is benign for FXII-HAE, as three healthy members of the family were also carriers of the mutation.

Another alteration (c.1025C>T, p.Pro342Leu), was detected in exon 10 of the *F12* gene in one type I C1-INH-HAE Polish patient bearing a pathogenic *SERPING1* mutation. c.1025C>T is reported as likely benign in ClinVar database (rs2230939) in patients with HAE and FXII deficiency. This mutation is detected in 0.1804% individuals of European origin and was predicted to be benign by both SIFT and PolyPhen2 bioinformatic tools. Our data support the previous characterization of the mutation as benign.

The alteration c.1530G>C (p.Glu510Asp) was identified in a 12-year old girl with hereditary angioedema presenting with five to six angioedema attacks per month located in the face. This mutation was predicted as probably damaging by both the bioinformatic tools used in this study (SIFT and PolyPhen2). There is no report of this mutation in ClinVar database and it is not detected amongst 115000 exomes of the ExAC database. Family segregation study identified the mutation in the father of the patient, who had no angioedema attacks during his life (Figure 2). However, FXII-HAE has a very low penetrance, particularly in males (over 90% of male carriers are asymptomatic compared with 40% of females) [19]. This substitution occurs at the

catalytic domain of the FXII protein. As the available evidence is currently insufficient to determine the role of this variant in FXII-HAE, we classify this mutation as a variant of uncertain significance (VUS). Nevertheless, it would be very interesting to test female probands of the patient's father, if any, in order to clarify its pathogenicity.

In one German patient the mutation c.1768T>G (p.Cys590Gly) in exon 14 of the *F12* gene was detected. The patient is presenting with recurrent angioedema of unclear origin. c.1768T>G is predicted deleterious by SIFT and possibly damaging by PolyPhen2 analysis. There is no report of this mutation in ClinVar database and is not detected amongst 115000 exomes of the ExAC database. The substitution occurs at the catalytic domain of the FXII protein and in the same nucleotide position a substitution has been described (c.1768T>A, p.Cys590Ser, rs1157280571) leading to loss of enzyme activity [20]. However, it is currently unclear if c.1768T>G is a pathogenic variant and thus it is characterized as a VUS for FXII-HAE.

The allele frequencies of all common polymorphisms (rs17876030, rs41309752 and rs17876047 and rs1801020) are similar with the corresponding allele frequencies presented in the ExAC database for the European population (Table I). The rare (c.1599A>G) synonymous variant, according to Human Splicing Finder 3 bioinformatic tool, is not predicted to have an effect in the splicing of the transcript.

It is concluded that high-throughput genomic technologies facilitate an extended analysis of genes involved in the pathogenesis of angioedema. However, the interpretation of their results represents a rather challenging attempt. In many genes, including *SERPING1*, a loss of function is a known disease mechanism and clearly deleterious variants (nonsense, frameshift, indels, splice defects) can be considered pathogenic. In *F12* gene, however, only specific variants lead to FXII-HAE, as causative variants must induce a gain of function in the encoded protein. This applies in missense or synonymous *F12* variants posing great challenges to interpretation. Loss of function variants in the gene are associated with Factor XII deficiency (OMIM: 234000), and thus are not expected to be identified in FXII-HAE patients. Furthermore, *F12* variants have been shown to have low penetrance, particularly in males, adding another level of difficulty. In the absence of functional and conclusive family segregation studies all missense variants, predicted to modify the structure of the protein and located outside exon 9 are characterized as VUS.

## References

1. Cicardi M, Aberer W, Banerji A, et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy* 2014; 69: 602-16.
2. Dewald G. A missense mutation in the plasminogen gene, within the plasminogen kringle 3 domain, in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 498: 193-8.
3. Bork K, Wulff K, Steinmüller-Magin L, et al. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy* 2018; 73: 442-50.
4. Bafunno V, Firinu D, D'Apolito M, et al. Mutation of the angiotensin-converting enzyme 1 gene (*ANGPT1*) associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141: 1009-17.
5. Loules G, Zamanakou M, Parsopoulou F, et al. Targeted next-generation sequencing for the molecular diagnosis of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Gene* 2018; 667: 76-82.
6. Bork K. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor activity including hereditary angioedema with coagulation factor XII gene mutations. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 6: 709-24.
7. Bork K, Wulff K, Meinke P, et al. A novel mutation in the coagulation factor XII gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clin Immunol* 2011; 141: 31-5.
8. Kiss N, Barabás E, Várnai K, et al. Novel duplication in the *F12* gene in a patient with recurrent angioedema. *Clin Immunol* 2013; 149: 142-5.

9. Speletas M, Szilágyi Á, Csuka D, et al. F12-46C/T polymorphism as modifier of the clinical phenotype of hereditary angioedema. *Allergy* 2015; 70: 1661-4.
10. Chaignon D, Ponard D, de Gennes C, et al. SERPING1 and F12 combined variants in a hereditary angioedema family. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2018; 121: 500-2.
11. Singhamatr P, Kanjanapongkul S, Rojnuckarin P. Molecular analysis of factor XII gene in Thai patients with factor XII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24: 599-604.
12. Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 43: 1286-9.
13. Cichon S, Martin L, Hennies HC, et al. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 1098-104.
14. Bork K, Kleist R, Hardt J, et al. Kallikrein - kinin system and fibrinolysis in hereditary angioedema due to factor XII gene mutation Thr309Lys. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20: 325-32.
15. Björkqvist J, de Maat S, Lewandrowski U, et al. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. *J Clin Invest* 2015; 125: 3132-46.
16. Magerl M, Gemenis AE, Maas C, Maurer M. Hereditary Angioedema with Normal C1 Inhibitor: Update on Evaluation and Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am* 2017; 37: 571-84.
17. de Maat S, Björkqvist J, Suffritti C, et al. Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138: 1414-23.e9.
18. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17: 405-24.
19. Caballero T, Canabal J, Rivero Paparoni D, et al. Management of hereditary angioedema in pregnant women: a review. *Int J Womens Health* 2014; 9: 839-48.
20. Miyata T, Kawabata S, Iwanaga S, et al. Coagulation factor XII (Hageman factor) Washington D.C.: inactive factor XIIa results from Cys-571-Ser substitution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 8319-22.



Contents lists available at ScienceDirect

Allergology International

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/alit>

## Original Article

A novel deep intronic *SERPING1* variant as a cause of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency

Sofia Vatsiou<sup>a, b</sup>, Maria Zamanakou<sup>a</sup>, Gedeon Loules<sup>a</sup>, Fotis Psarros<sup>c</sup>,  
Faidra Parsopoulou<sup>a, b</sup>, Dorottya Csuka<sup>d</sup>, Anna Valerieva<sup>e</sup>, Maria Staevska<sup>e</sup>,  
Grzegorz Porebski<sup>f</sup>, Krystyna Obtulowicz<sup>f</sup>, Markus Magerl<sup>g</sup>, Marcus Maurer<sup>g</sup>,  
Matthaios Speletas<sup>b</sup>, Henriette Farkas<sup>d</sup>, Anastasios E. Germeris<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> CeMIA SA, Larissa, Greece<sup>b</sup> Department of Immunology & Histocompatibility, University of Thessaly, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Larissa, Greece<sup>c</sup> Department of Allergy, Navy Hospital, Athens, Greece<sup>d</sup> Hungarian Angioedema Reference Center, 3rd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary<sup>e</sup> Clinic of Allergy and Asthma, Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria<sup>f</sup> Department of Clinical and Environmental Allergy, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland<sup>g</sup> Department of Dermatology and Allergy, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 October 2019

Received in revised form

29 November 2019

Accepted 23 December 2019

Available online 17 January 2020

## Keywords:

C1-inhibitor deficiency

Hereditary angioedema

Intronic mutations

Next-generation sequencing

*SERPING1* gene

## Abbreviations:

ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics; ASSP, Alternative Splice Site Predictor; AMP, Association for Molecular Pathology; C1-INH, C1-inhibitor; C1-INH-HAE, hereditary angioedema due to C1-INH deficiency; CADD, Combined Annotation Dependent Depletion; GERP, Genomic Evolutionary Rate Profiling; HSF, Human Splicing Finder; ISS, intronic splicing silencer; NGS, next-generation sequencing

## ABSTRACT

**Background:** In about 5% of patients with hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency (C1-INH-HAE) no mutation in the *SERPING1* gene is detected.

**Methods:** C1-INH-HAE cases with no mutation in the coding region of *SERPING1* after conventional genotyping were examined for defects in the intronic or untranslated regions of the gene. Using a next-generation sequencing (NGS) platform targeting the entire *SERPING1*, 14 unrelated C1-INH-HAE patients with no detectable mutations in the coding region of the gene were sequenced. Detected variants with a global minor allele frequency lower than the frequency of C1-INH-HAE (0.002%), were submitted to *in silico* analysis using ten different bioinformatics tools. Pedigree analysis and examination of their pathogenic effect on the RNA level were performed for filtered in variants.

**Results:** In two unrelated patients, the novel mutation c.-22-155G > T was detected in intron 1 of the *SERPING1* gene by the use NGS and confirmed by Sanger sequencing. All bioinformatics tools predicted that the variant causes a deleterious effect on the gene and pedigree analysis showed its co-segregation with the disease. Degradation of the mutated allele was demonstrated by the loss of heterozygosity on the cDNA level. According to the American College of Medical Genetics and Genomics 2015 guidelines the c.-22-155G > T was curated as pathogenic.

**Conclusions:** For the first time, a deep intronic mutation that was detected by NGS in the *SERPING1* gene, was proven pathogenic for C1-INH-HAE. Therefore, advanced DNA sequencing methods should be performed in cases of C1-INH-HAE where standard approaches fail to uncover the genetic alteration.

Copyright © 2020, Japanese Society of Allergology. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Corresponding author. Department of Immunology & Histocompatibility, Faculty of Medicine, University of Thessaly, 3 Panepistimiou str., Biopolis, 41500, Larissa, Greece.

E-mail address: [agermen@med.uth.gr](mailto:agermen@med.uth.gr) (A.E. Germeris).

Peer review under responsibility of Japanese Society of Allergology.

<https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.12.009>

1323-8930/Copyright © 2020, Japanese Society of Allergology. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

C1-INH-HAE (OMIM#106100) is a potentially fatal autosomal dominant disease that manifests clinically with episodes of non-pruritic and nonpitting swelling of the deeper layers of the skin or mucosa.<sup>1</sup> The disease is caused by mutations of the *SERPING1* gene, which encodes for C1-INH. *SERPING1* is located on chromosome 11 and consists of 8 exons.<sup>2</sup> Currently, 748 different disease-causing *SERPING1* variants have been published.<sup>3</sup> However, in

approximately 5% of C1-INH-HAE patients no causal mutation is identified by standard mutational screening which is ordinarily restricted to the coding exons and exon-intron boundaries of the *SERPING1* gene.<sup>4,5</sup>

Intronic sequences were initially assumed to be largely non-functional and mutations located deep within introns (i.e., more than 100 base pairs away from exon-intron boundaries) were ignored as possible causes of human disease. However, genomic approaches in clinically oriented studies have identified many deep intronic variants with significant association to diseases, and intron functionality is supported by several independent lines of evidence.<sup>6,7</sup> Recently, Vaz-Drago *et al.*<sup>7</sup> have reviewed, between 1983 and 2016, 185 deep intronic mutations across 77 different disease-associated genes.

Hitherto, conventional methods for genotyping of C1-INH-HAE patients did not allow the analysis of *SERPING1* intronic regions. Even when some introns are sequenced along with their upstream and downstream exons, possible detection of deep intronic variants is disregarded. Thus, no deep intronic variant has been reported in association with C1-INH-HAE. To overcome some of the shortcomings of traditional approaches we recently developed a short-next-generation sequencing (NGS) platform that allows analyzing *SERPING1* in its full length.<sup>8</sup> Here, we use this platform for genotyping C1-INH-HAE patients with no detectable mutations in the coding region of *SERPING1*, and we describe our results and their relevance.

## Methods

### Study population

Fourteen patients (3 Greek, 2 Hungarian, 4 Polish, 3 Bulgarian, 2 German; 5 male, mean age 43 ± 17 years) diagnosed with type I C1-INH-HAE, according to the criteria of the Hereditary Angioedema International Working Group,<sup>9</sup> but without *SERPING1* mutations after conventional molecular analysis, were initially enrolled in the study. Pedigree analysis became feasible in one case. Three healthy first degree relatives of the patient and three first degree relatives with C1-INH-HAE were examined. Informed consent was obtained from all patients and family members investigated, and the study has been approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Thessaly.

### Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood with iPrep PureLink DNA blood kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Conventional genotyping had been performed by sequencing all *SERPING1* translated regions and intron-exon boundaries, long-range PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), as previously described.<sup>4</sup>

A custom NGS panel was designed by the Ion AmpliSeq Thermo Fisher Scientific Designer, as previously described,<sup>8</sup> covering the whole *SERPING1* gene (NM\_000062.2) including its complete 5' and 3' untranslated regions, exonic and intronic regions (Chr11: 57,364,831–57,382,476; GRCh37). Coverage of 99.9% and 79.9% of exonic and intronic regions of *SERPING1* was achieved, respectively. Missing intronic regions were mainly those of introns 3, 4, and 6 (41.4%, 42.2% and 22.5%, respectively). Briefly, amplicon libraries were prepared using the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Ion Xpress™ Barcode Adapter 1–96 Kit (Thermo Fisher Scientific). Pooled, barcoded libraries were clonally amplified using the Ion OneTouch™ system and Ion OT2 HI-Q Template kit (Thermo Fisher Scientific). Ion sphere particles (ISPs) were enriched with the Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads (Thermo Fisher Scientific) and

washed with the Ion OneTouch Wash Solution included in the kit using the Ion One Touch ES system (Thermo Fisher Scientific). NGS was performed on the Personal Genome Machine (PGM) using the Ion PGM Hi-Q sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) resulting in a mean depth of coverage 20x. All procedures were performed according to the manufacturer's instructions.

Torrent Suite 5.2 software was used for the analysis of NGS data. Raw data were aligned to the complete *SERPING1* gene of the human reference sequence hg19 (GRCh37), variant calling was performed by the VariantCaller v.5.2 plug-in and coverage analysis by the coverageAnalysis v.5.2.1.2 plug-in. Annotation of variants was performed on Ion Reporter software v.5.2 (Thermo Fisher Scientific). The annotated variants were evaluated and visualized via integrative genome viewer (IGV).

Variants that were present in the reference population data sets [Genome Aggregation Database (gnomAD), Exome Aggregation Consortium<sup>10</sup> release 0.3 (ExAC Browser), Database of Single Nucleotide Polymorphisms<sup>11</sup> build 141 GRCh37.p13 (dbSNP)] at a global minor allele frequency greater than that the frequency C1-INH-HAE (<0.002%) were filtered out from the analysis.

Sanger sequencing was performed for the confirmation of novel variants and family segregation study. The intron 1 of the *SERPING1* gene was amplified by using the primers 5'-CTGACC-CAAGTTCCTCCCGTTCAC-3' and 5'-CCCGTCCCCATCCACAAG-3'. The PCR was initiated at 94 °C for 2 min, followed by denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 65 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 1 min for 30 cycles. The amplified products were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyzed in ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Data were evaluated by the Sequencing Analyses software 5.2 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).<sup>12</sup>

### In silico analyses

The putative effect of filtered-in intronic mutations was evaluated by using ten different bioinformatics analysis tools. Sequence segments with and without corresponding changes in their sequences were submitted to five bioinformatics tools examining potential splice effects: NNSPLICE,<sup>13</sup> Netgene2,<sup>14</sup> ASSP,<sup>15</sup> FSPLICE and HSF.<sup>16</sup> All of them provide probability scores for the use of potential donor and acceptor splice sites. Further assessment of the pathogenicity was attempted by the use of 5 additional tools. The CADD provides prediction of the functional impact of the observed variants by integrating different functional aspects and diverse annotations into a single outcome, namely the C-score<sup>17</sup>; the Transcript-inferred Pathogenicity score (Trap score) evaluates a single nucleotide variant's ability to cause disease by damaging the final transcript<sup>18</sup>; DANN is a pathogenicity scoring methodology based on deep neural networks<sup>19</sup>; GERP is a conservation score calculated by quantifying substitution deficits across multiple alignments of orthologues using the genomes of 35 mammals<sup>20</sup>; finally, SpliceAid 2 bioinformatics foresee the splicing pattern alteration and guide the identification of the molecular effect due to the mutations.<sup>21</sup>

### Transcriptional analysis

In order to further evaluate the function effect of the variant c.-22-155G > T, whole blood was collected from the proband and his three suffering family members carrying the mutation and being heterozygous for the rs4926 (c.1438G > A) polymorphism. Mononuclear cells were separated by a Ficoll gradient, and total RNA was extracted with phenol-chloroform, ethanol precipitated, and purified by guanidinium thiocyanate dissociation and isopropanol

precipitation.<sup>22,23</sup> First-Strand cDNA was synthesized from 1 µg RNA in 25 µl reactions with 25 µM Primer random p[dN]6 (Roche), 10 mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 200 U/µL M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) employed in 72 °C for 2 min, 42 °C for 75 min and 65 °C for 10 min.

In the produced cDNA, a fragment from exons 6–8 was amplified, sequenced and compared to the gDNA sequence. The forward 5'AACTCAGTTATAAAAGTGCCCATGATGAAT3'<sup>24</sup> and the reverse 5'CCCTTTGGTGGATAGCG-3'<sup>25</sup> primers were used. The amplification of the cDNA was performed using 10 pmol of each primer and 35 cycles in a Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA), comprising of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C, followed by a final extension of 10 min at 72 °C. The amplified products were sequenced and analyzed, as described above.

#### Variant curation

The interpretation of sequence variants was based on the criteria established by the ACMG and the AMP.<sup>26</sup> Data from our previous study<sup>8</sup> in regard with the presence of variants in healthy individuals were used to this aim.

#### Results

Apart from the known polymorphisms rs28362944 and rs4926, NGS genotyping of our C1-INH-HAE patients confirmed the absence of disease-causing *SERPING1* exonic mutations. However, 35 different intronic mutations were revealed in these patients, 29 of which were filtered out as their global minor allele frequency was greater than

**Table 1**  
Filtered out intronic mutations presenting in the Genome Aggregation Database (gnomAD) with a global minor allele frequency greater than 0.002%.

Locus	Genotype	Coding	dbSNP	Intron	Frequency (%)
chr11:57365895	G/A	c.51 + 101G > A	rs28362945	2	12.56
chr11:57366405	C/CGT	c.51 + 625_51 + 626dupTG	rs3054018	2	38.99
chr11:57366656	C/T	c.52–696C > T	rs1005511	2	39.51
chr11:57367222	C/T	c.52–130C > T	rs1005510	2	38.72
chr11:57369008	C/G	c.551–500C > G	rs28362947	3	22.03
chr11:57369013	A/C	c.551–495A > C	rs28362948	3	22.03
chr11:57369353	A/G	c.551–155A > G	rs2936694	3	36.84
chr11:57369730	G/A	c.685 + 88G > A	rs11229063	4	22.24
chr11:57370742	C/T	c.685 + 1100C > T	rs78364821	4	22.52
chr11:57371911	G/T	c.686–1572G > T	rs28362949	4	22.08
chr11:57371918	G/A	c.686–1565G > A	rs28362950	4	22.42
chr11:57372526	A/G	c.686–957A > G	rs28362951	4	22.19
chr11:57373304	A/G	c.686–179A > G	rs189335964	4	0.1068
chr11:57374280	G/A	c.1029 + 260G > A	rs191053716	6	0.1356
chr11:57374332	T/C	c.1029 + 312T > C	rs11603020	6	22.79
chr11:57374871	C/G	c.1029 + 851C > G	rs11229066	6	22.79
chr11:57374946	G/T	c.1029 + 926G > T	rs11229067	6	22.79
chr11:57375463	G/C	c.1029 + 1443G > C	rs78624400	6	22.82
chr11:57375517	A/G	c.1029 + 1497A > G	rs17661117	6	0.6972
chr11:57376130	T/C	c.1029 + 2110T > C	rs2454659	6	61.20
chr11:57376131	A/G	c.1029 + 2111G > A	rs138770460	6	22.7
chr11:57377215	G/C	c.1030–1975G > C	rs151035150	6	1.1044
chr11:57377676	CT/C	c.1030–1513delT	rs1184255008	6	0.003227
chr11:57377968	A/G	c.1030–1222A > G	rs3824988	6	22.78
chr11:57377992	G/T	c.1030–1198G > T	rs2508443	6	32.92
chr11:57378325	C/T	c.1030–865C > T	rs2511989	6	38.14
chr11:57379170	A/G	c.1030–20A > G	rs2511988	6	61.09
chr11:57381263	T/C	c.1250–538T > C	rs10896631	7	22.76
chr11:57381519	T/C	c.1250–282T > C	rs1557522	7	30.64

**Table 2**  
Bioinformatic analysis of the six filtered-in intronic mutations.

Variant	NNSPLICE <sup>†</sup>	Netgene2 <sup>‡</sup>	ASSP <sup>§</sup>	FSPLICE <sup>¶</sup>	HSF <sup>  </sup>	CADD <sup>#</sup>	Trap score <sup>††</sup>	DANN <sup>†††</sup>	GERP RS <sup>§§</sup>
c.-22-155G > T	D:0.96	D:0.79	D:0.46	D:10.16	New intronic cryptic donor site	21.2	0.686	0.9507	1
c.551-156A > G	NI	NI	NI	NI	Creation of an ISE	1.427	0.103	0.3543	NP
c.686–1488_686–1487insT	NI	NI	NI	NI	Creation of an ISE	NP	NP	NP	0.0435
c.686–1335T > A	NI	NI	NI	NI	Alteration of an ISS/Creation of an ISE	0.131	0.078	0.1134	–1.335
c.686–1333A > T	NI	NI	NI	NI	NI	0.969	0.012	0.1669	–1.875
c.1250-154C > G <sup>¶¶</sup>	NI	NI	NI	NI	Creation of an ISE	3.911	0.122	0.5833	0.3333

NI, No impact; NP, Not provided; D, new donor; ISS, Intronic splicing silencer; ISE, Intronic splicing enhancer.

<sup>†</sup> Range 0–1, with minimum score for 5' and 3' splice site 0.4 ([www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)).

<sup>‡</sup> Confidence range 0.5–0.95 ([www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/)).

<sup>§</sup> Confidence range 0–1, false splice site cutoff for acceptor sites: 2.2, false splice site cutoff for donor sites: 4.5 (Alternative Splice Site Predictor: [wangcomputing.com/assp/](http://wangcomputing.com/assp/)).

<sup>¶</sup> Acceptor site threshold: 4.175, donor site threshold: 6.099 ([www.softberry.com/berry.phtml?topic=splice&group=programs&subgroup=gfind](http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=splice&group=programs&subgroup=gfind)).

<sup>||</sup> [www.umd.be/HSF/HSF.shtml](http://www.umd.be/HSF/HSF.shtml).

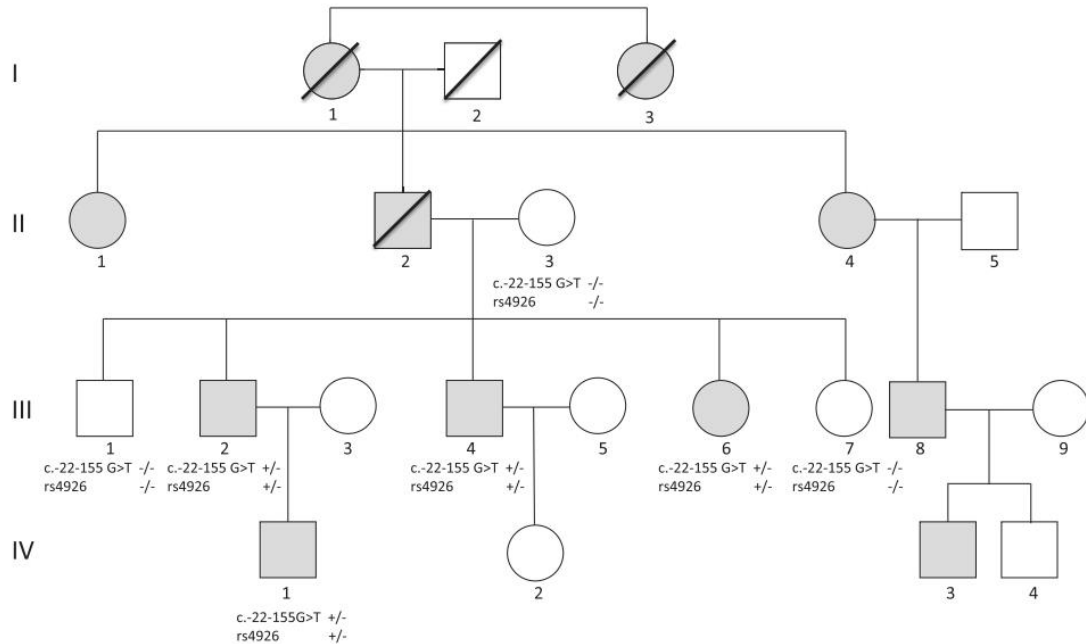
<sup>#</sup> Range 10–30 ([cadd.gs.washington.edu](http://cadd.gs.washington.edu)).

<sup>††</sup> Range 0–1 (<http://trap-score.org/Search?version=v2>).

<sup>†††</sup> Range 0–1.

<sup>§§</sup> –12.3 to 6.17.

<sup>¶¶</sup> Observed in 2 patients (trans with the c.-22-155G > T variant) and one healthy member of the studied family.



**Fig. 1.** Pedigree analysis of a C1-INH-HAE family carrying the deep intronic c.-22-155G > T variant. All examined suffering members of the family (III.2, III.4, III.6, IV.1) –carriers of the c.-22-155G > T– were heterozygous for the rs4926 (c.1438G > A) polymorphism, while all examined unaffected members (II.3, III.1, III.7) were homozygous for the wild type of this polymorphism.

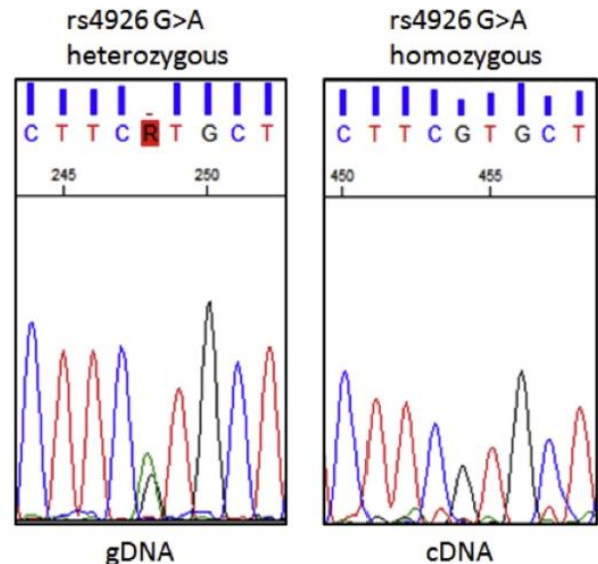
0.002% (Table 1). Four out of the remaining 6 variants were unreported (novel), and 2 were reported once in global databases.

Only one of the six filtered-in variants, the novel variant c.-22-155G > T located in intron 1 of the *SERPING1* gene (chr11:57,365,567), was predicted as pathogenic by all used bioinformatics tools (Table 2). Moreover, this variant was also the only one that was detected in two unrelated C1-INH-HAE Greek patients, i.e. with a frequency 14.3% among the cohort of our C1-INH-HAE patients without any mutation in the exonic region of the gene, while it was also undetectable in our healthy control group.<sup>8</sup> Assuming a 5% frequency of C1-INH-HAE patients with no causal mutation identified in the coding exons and exon-intron boundaries of the *SERPING1* gene,<sup>4,5</sup> the estimated frequency of this variant among C1-INH-HAE patients is 0.7%. Thus, the c.-22-155G > T variant was the only one that was further studied.

Pedigree analysis revealed that the c.-22-155G > T variant cosegregated with C1-INH-HAE in all of the 4 analyzed patients belonging to two generations, while it was absent from all of the 3 healthy family members who were also analyzed (Fig. 1). Examined patients were of 8, 40, 44 and 45 (the proband, III.2) years-of-age with an age at disease onset of 8, 7, 24 and 13 years, and a mean frequency of attacks (mainly cutaneous) 2, 5, 14 and 5 per year, respectively. Their antigenic C1-INH concentration at diagnosis was varying from 4% to 40% of the reference. Information about the other suffering members of the family was unobtainable since they are immigrants in Australia. The fifth, unrelated patient examined was a man of 45 years-of-age without family history of angioedema presenting with rare cutaneous attacks since the age of 25 years. No other member of his family was available for analysis.

Further bioinformatic analysis with the use of SpliceAid 2 tool showed that the c.-22-155G > T variant alters the transcriptional motif recognized by hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F and hnRNP H3 transcriptional factors preventing their binding in the corresponding gene region.

Transcript analysis supported the above indications of the deleterious effect of the c.-22-155G > T variant. By this approach loss of heterozygosity was demonstrated for the exon 8 rs4926 (c.1438G > A) polymorphism located in the same allele with the c.-22-155G > T variant. More specifically, as it is shown in Figure 1, in the gDNA, all



**Fig. 2.** cDNA and gDNA sequencing of one of the patients (III.6) carrying the c.-22-155G > T variant and the rs4926 G > A polymorphism. Sequencing of the amplified cDNA demonstrate that while in the gDNA the two alleles (G/A) of the rs4926 are equally represented, in the cDNA only one allele (G) is present.

**Table 3**

The 49 reported intronic mutations in *SERPING1* gene associated with C1-INH-HAE. The majority of them are located in the donor and acceptor site or a few (up to 5) nucleotides from these regions. Only the c.1029 + 84G > A mutation is located 84 nucleotides from the acceptor site.

Mutation	Intron	Chromosome position	dbSNP	References
c.-22-2A > C	1	chr11:57365720		Aabom et al., 2017 <sup>33</sup>
c.-22-2A > G	1	chr11:57365720		Bygum et al., 2011 <sup>34</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.-22-1G > A	1	chr11:57365721		Verpy et al., 1996 <sup>35</sup> ; Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup> ; Duponchel et al., 2006 <sup>37</sup> ; Andrejević et al., 2015 <sup>38</sup>
c.51+6T > G	2	chr11:57365800		López-Lera et al., 2011 <sup>39</sup>
c.51+5G > A	2	chr11:57365799		Verpy et al., 1996 <sup>35</sup> ; Duponchel et al., 2006 <sup>37</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.51 + 1G > T	2	chr11:57365795		Yamamoto et al., 2012 <sup>40</sup> ; Cagini et al., 2016 <sup>41</sup>
c.51 + 1G > A	2	chr11:57365795	rs1470120365	Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Pappalardo et al., 2008 <sup>4</sup> ; Kalmár et al., 2003 <sup>42</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.51 + 2T > C	2	chr11:57365796		Cagini et al., 2016 <sup>41</sup>
c.51 + 3A > G	2	chr11:57365797		Roche et al., 2005 <sup>43</sup> ; Pappalardo et al., 2008 <sup>4</sup> ; Duponchel et al., 2006 <sup>37</sup>
c.52-2A > G	2	chr11:57367350		Pappalardo et al., 2008 <sup>4</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.52-1 G > A	2	chr11:57367351	rs886041353	Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.550+1G > A	3	chr11:57367851		Kalmár et al., 2003 <sup>42</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.550+2T > C	3	chr11:57367852		Roche et al., 2005 <sup>43</sup>
c.550 + 5G > C	3	chr11:57367855		Roche et al., 2005 <sup>43</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.550 + 5G > A	3	chr11:57367855	rs1314284778	Roche et al., 2005 <sup>43</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.551-2delA	3	chr11:57369506		Roche et al., 2005 <sup>43</sup>
c.551-1G > A	3	chr11:57369507		Speletas et al., 2015 <sup>5</sup>
c.551-2A > G	3	chr11:57369506		Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Grodecká et al., 2017 <sup>44</sup>
c.551-3 C > G	3	chr11:57369505		Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup>
c.551-5 T > A	3	chr11:57369503		Pappalardo et al., 2008 <sup>4</sup>
c.685 + 31G > A	4	chr11: 57369673	rs751335805	Suffritti et al., 2014 <sup>45</sup>
c.685 + 1G > T	4	chr11:57369643		Pappalardo et al., 2008 <sup>4</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.685 + 1 G > A	4	chr11:57369643	rs113263597	Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.685 + 2T > A	4	chr11:57369644		Colobran et al., 2014 <sup>46</sup>
c.685 + 2T > G	4	chr11:57369644		Pappalardo et al., 2008 <sup>4</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.686-12 A > G	4	chr11: 57373471		Pappalardo et al., 2008 <sup>4</sup> ; Grodecká et al., 2017 <sup>44</sup> ; Andrejević et al., 2015 <sup>38</sup>
c.686-3C > G	4	chr11:57373480		Roche et al., 2005 <sup>43</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.889 + 1 G > T	5	chr11:57373687		Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.889 + 2T > C	5	chr11:57373688		Roche et al., 2005 <sup>43</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.889 + 3A > T	5	chr11:57373689		Johnsrud et al., 2015 <sup>47</sup>
c.890-14C > G	5	chr11: 57373867		Speletas et al., 2015 <sup>5</sup>
c.890-2A > G	5	chr11: 57373879		Bowen et al., 2001 <sup>12</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.890-1G > A	5	chr11: 57373880		Sekijima et al., 2004 <sup>48</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.1029 + 1 G > T	6	chr11:57374021		Siddique et al., 1991 <sup>49</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.1029 + 1 G > A	6	chr11:57374021		Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.1029 + 84G > A	6	chr11:57374104	rs118132731	Pappalardo et al., 2008 <sup>4</sup>
c.1029 + 3_	6	chr11:57374023		Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup>
c.1029 + 6 del4bp	6			
c.1029 + 4 delA	6	chr11:57374024		Bygum et al., 2011 <sup>34</sup>
c.1030-1 G > A	6	chr11:57379189		Speletas et al., 2015 <sup>5</sup>
c.1030-1 G > C	6	chr11:57379189		Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Verpy et al., 1996 <sup>35</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.1249 + 1G > C	7	Chr11: 57379410		López-Lera et al., 2011 <sup>39</sup>
c.1249 + 1G > A	7	Chr11: 57379410	rs112565881	Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.1249 + 2T > A	7	Chr11: 57379411		Kawachi et al., 1998 <sup>50</sup> ; Xiong et al., 2015 <sup>6</sup>
c.1249 + 2delT	7	Chr11: 57379411		Roche et al., 2005 <sup>43</sup>
c.1249 + 5G > T	7	Chr11: 57379414		Pappalardo et al., 2008 <sup>4</sup> ; Grodecká et al., 2017 <sup>44</sup>
c.1249 + 5G > A	7	Chr11: 57379414		Colobran et al., 2017 <sup>23</sup> ; Grodecká et al., 2017 <sup>44</sup>
c.1250-13 G > A	7	chr11: 57381788		Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup> ; Kesim et al., 2011 <sup>51</sup>
c.1250-1G > A	7	chr11: 57381800		Aabom et al., 2017 <sup>33</sup>
c.1250-2 A > G	7	chr11: 57381799		Gösswein et al., 2008 <sup>36</sup>

patients of the examined family –carriers of the c.-22-155G > T– were heterozygous for the rs4926 (c.1438G > A) polymorphism, while all unaffected members were homozygous for the wild type. Interestingly, in the cDNA, all patients were found homozygous for the wild type –only one allele (G) is present– indicating that the mRNA from the mutated allele is probably degraded (Fig. 2).

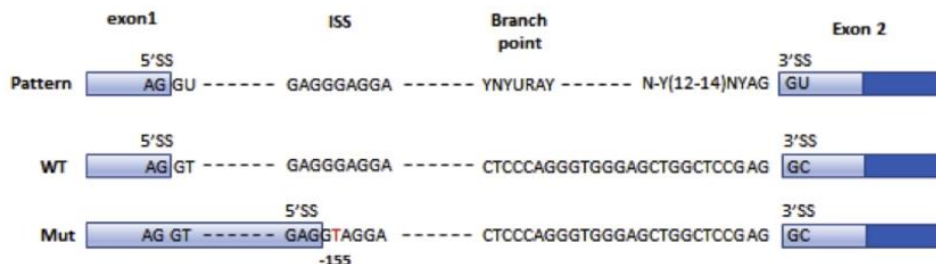
According to the ACMG-AMP 2015 guidelines<sup>26</sup> the pathogenicity potential of the c.-22-155G > T variant is “pathogenic” based on: (a) The strong segregation data. The variant co-segregates with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease (PPI criterion used as strong evidence). (b) The absence of the variant from controls in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium (PM2). (c) The observation of the variant in two unrelated probands with the same phenotype, and its absence in controls (PS4). (d) Prediction by multiple bioinformatics tools that the variant causes a

deleterious effect on the gene (PP3). (e) The patient’s phenotype and family history is highly specific for the disease (PP4). (f) *In vitro* functional studies support a damaging effect on the gene (PS3). Based on the available criteria (BS2, BS4, BP4, BP5) the remaining intronic variants detected in our C1-INH-HAE patients were classified as “benign” or “likely benign”.

## Discussion

To identify missing noncoding variants in C1-INH-HAE cases, we sequenced the *SERPING1* locus in 14 patients. In two of them, we detected a novel deep intronic variant (c.-22-155G > T) which was classified as pathogenic, according to ACMG-AMP 2015 guidelines.<sup>26</sup> In recent years, increasing numbers of deep intronic variants located at least 100 bp from the nearest canonical splice site, have been reported and their role in human diseases has been





**Fig. 3.** Graphical presentation of the impact of the c.-22-155G > T variant according to bioinformatics analysis. The variant is predicted to form an alternative donor site leading to a modified mutant RNA longer (>372 bp) than the wild type.

largely demonstrated. To the best of our knowledge, this is the first deep intronic variant of *SERPING1* gene associated with C1-INH-HAE that has been reported in the literature. Heretofore, 49 different intronic mutations of *SERPING1* gene have been associated with C1-INH-HAE, all of them located in the donor and acceptor site or a few nucleotides from these regions<sup>4–6,12,25,33–51</sup> (Table 3).

Deleterious deep intronic variants most commonly lead to pseudo-exon inclusion due to activation of non-canonical splice sites or changes in splicing regulatory elements, or they can disrupt transcription regulatory motifs and non-coding RNA genes.<sup>7</sup> As far as the c.-22-155G > T variant is regarded, the most probable scenario indicated by the findings of the *in silico* and the transcriptional analysis, is that it affects splicing and alters the transcribed RNA. The mutant mRNA is susceptible to degradation by mRNA surveillance pathways. Consequently, only the wild type allele is translated, and this results in C1-INH deficiency.

In more detail, by the use of the NNSPLICE, NetGene2 and FSPLICE, ASSP bioinformatics tools, it has been shown that the c.-22-155G > T variant introduces in the genome a new donor site stronger than the wild type leading to a larger exon 1 in the RNA level (Fig. 3). This was confirmed by HSF indicating, in parallel, that the variant disrupts an ISS recognized by a number of transcriptional factors and, as a result, stops the suppression of the intronic cryptic donor site. Additionally, by analyzing both the wild type and the mutated sequence, SpliceAid 2 concluded that different splicing motifs are destroyed, including the splicing motifs for the transcriptional factors hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP F, hnRNP H3 which act as silencers in the wild type sequence. Transcriptional analysis confirmed that the mutant mRNA is susceptible to degradation. To this aim, an informative exonic SNP, i.e. the polymorphism rs4926 (c.1438G > A) carried by the patients in heterozygous state, was used. On the RNA level, this polymorphism was found in homozygous state, which indicates that the mutated allele is degraded, obviously through mRNA surveillance pathways. Further studies are required in order to define which of the three translation-associated mRNA surveillance pathways (nonsense-mediated mRNA decay, no-go decay, nonstop decay) that target mRNAs for degradation is involved.<sup>7</sup>

In favor of the pathogenicity of the c.-22-155G > T variant is its location in a chromosomal region of intron 1 which, by the use of GERP, a statistically rigorous and biologically transparent framework for constrained element identification,<sup>27</sup> was found highly conserved. Generally, it is considered that the first intron is highly conserved and that its conservation is related to its enrichment with regulatory elements<sup>28</sup> and a specific pattern of chromatin organization.<sup>29</sup> However, the first intron of *SERPING1* is not the longest among all other downstream introns within the gene as it happens in most species.<sup>30</sup>

In conclusion, our study verified the earlier hypothesis that intronic alterations could be the cause of the disease in cases of C1-

INH-HAE where standard genotyping approaches cannot uncover any DNA damage, highlighting one more advantage of NGS<sup>8</sup> in the molecular analysis of these patients.<sup>31</sup> Therefore, advanced DNA sequencing methods should be performed in cases of C1-INH-HAE where standard approaches fail to uncover the genetic alteration. Finally, despite that one fifth of *SERPING1* intronic length is escaping the analysis by our NGS panel, the possibility of intronic alterations to be the invisible damage whenever standard genotyping cannot detect the cause of C1-INH-HAE, is minimized. The regulatory mechanisms of gene expression comprise diverse molecular circuits involving multiple dedicated components. Thus mechanisms intervening to the expression of *SERPING1*, other than alterations in non-coding regions, should be considered. As Dirk A. Kleinjan and Veronica van Heyningen have noted<sup>32</sup>: "... the laborious identification of the disease loci and regulatory mechanisms involved in currently 'unsolved' human disorders remains a huge but rewarding task".

#### Conflict of interest

MZ, GL and FPa are employed by CeMIA SA. AEG is stock owner of CeMIA SA. The rest of the authors have no conflict of interest.

#### Authors' contributions

SV participated in the study design, carried out the basic experimental analysis and data interpretation and drafted the manuscript. MZ and GL conceived and participated in the design of the study, carried out the data interpretation and performed critical revision of the manuscript. FPa involved in some of the basic experimental analyses. FPs, DC, AV, MS, GP, KO, MMag, MMau, MS and HF were responsible for collection of blood samples and assembly of clinical data. AEG conceived and coordinated the study, participated in the study design, and critically revised of the article for important intellectual content. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

#### References

- Longhurst H, Cicardi M. Hereditary angio-oedema. *Lancet* 2012;**379**:474–81.
- Germenis AE, Speletas M. Genetics of hereditary angioedema revisited. *Clin Rev Allergy Immunol* 2016;**51**:170–82.
- Ponard D, Gaboriaud C, Charignon D, Ghannam A, Wagenaar-Bos IGA, Roem D, et al. *SERPING1* mutation update: mutation spectrum and C1 inhibitor phenotypes. *Hum Mutat* 2020;**41**:38–57.
- Pappalardo E, Caccia S, Suffritti C, Tordai A, Zingale LC, Cicardi M. Mutation screening of C1 inhibitor gene in 108 unrelated families with hereditary angioedema: functional and structural correlates. *Mol Immunol* 2008;**45**:3536–44.
- Speletas M, Szilagyi A, Psarros F, Moldovan D, Magerl M, Kompoti M, et al. Hereditary angioedema: molecular and clinical differences among European populations. *J Allergy Clin Immunol* 2015;**135**:570–3.
- Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, et al. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science* 2015;**347**:1254806.
- Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet* 2017;**136**:1093–111.
- Loules G, Zamanakou M, Parsopoulou F, Vatsiou S, Psarros F, Csuka D, et al. Targeted next-generation sequencing for the molecular diagnosis of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Gene* 2018;**667**:76–82.

9. Cicardi M, Aberer W, Banerji A, Bas M, Bernstein JA, Bork K, et al. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy* 2014;**69**: 602–16.
10. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016;**536**:285–91.
11. Sherry ST, Ward M-H, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001;**29**:308–11.
12. Bowen B, Hawk JJ, Sibunka S, Hovick S, Weiler JM. A review of the reported defects in the human C1 esterase inhibitor gene producing hereditary angioedema including four new mutations. *Clin Immunol* 2001;**98**:157–63.
13. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 1997;**4**:311–23.
14. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol* 1991;**220**:49–65.
15. Wang M, Marin A. Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene* 2006;**366**:219–27.
16. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009;**37**:e67.
17. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 2014;**46**:310–5.
18. Gelfman S, Wang Q, McSweeney KM, Ren Z, La Carpija F, Halvorsen M, et al. Annotating pathogenic non-coding variants in genic regions. *Nat Commun* 2017;**8**:236.
19. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics* 2015;**31**:761–3.
20. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, NISC Comparative Sequencing Program, Green ED, Batzoglou S, et al. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res* 2005;**15**:901–13.
21. Piva F, Giulietti M, Burini AB, Principato G. SpliceAid 2: a database of human-splicing factors expression data and RNA target motifs. *Hum Mutat* 2012;**33**: 81–5.
22. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;**1**:581–5.
23. Peirson SN, Butler JN. RNA extraction from mammalian tissues. *Methods Mol Biol* 2007;**362**:315–27.
24. Ariga T, Igarashi T, Ramesh N, Parad R, Cicardi M, Davis 3rd AE. Type I C1 inhibitor deficiency with a small messenger RNA resulting from deletion of one exon. *J Clin Invest* 1989;**83**:1888–93.
25. Colobran R, Pujol-Borrell R, Hernández-González M, Guilarte M. A novel splice site mutation in the SERPING1 gene leads to haploinsufficiency by complete degradation of the mutant allele mRNA in a case of familial hereditary angioedema. *J Clin Immunol* 2014;**34**:521–3.
26. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;**17**:405–24.
27. Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol* 2010;**6**:e1001025.
28. Gaffney DJ, Keightley PD. Unexpected conserved non-coding DNA blocks in mammals. *Trends Genet* 2004;**20**:332–7.
29. Bieberstein NI, Carrillo Oesterreich F, Straube K, Neugebauer KM. First exon length controls active chromatin signatures and transcription. *Cell Rep* 2012;**2**:62–8.
30. Bradnam KR, Korf I. Longer first introns are a general property of eukaryotic gene structure. *PLoS One* 2008;**3**:e3093.
31. Marcelino-Rodríguez I, Callero A, Mendoza-Alvarez A, Perez-Rodríguez E, Barrios-Recio J, García-Robaina JC, et al. Bradykinin-mediated angioedema: an update of the genetic causes and the impact of genomics. *Front Genet* 2019;**10**: 900.
32. Kleinjan DA, van Heyningen V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet* 2005;**76**: 8–32.
33. Aabom A, Andersen KE, Fagerberg C, Fisker N, Jakobsen MA, Bygum A. Clinical characteristics and real-life diagnostic approaches in all Danish children with hereditary angioedema. *Orphanet J Rare Dis* 2017;**12**:55.
34. Bygum A, Fagerberg CR, Ponard D, Monnier N, Lunardi J, Drouet C. Mutational spectrum and phenotypes in Danish families with hereditary angioedema because of C1 inhibitor deficiency. *Allergy* 2011;**66**:76–84.
35. Verpy E, Biasotto M, Brai M, Misiano G, Meo T, Tosi M. Exhaustive mutation scanning by fluorescence-assisted mismatch analysis discloses new genotype-phenotype correlations in angioedema. *Am J Hum Genet* 1996;**59**:308–19.
36. Gösswein T, Kocot A, Emmert G, Kreuz W, Martínez-Saguer I, Aygören-Pürsün E, et al. Mutational spectrum of the C1INH (SERPING1) gene in patients with hereditary angioedema. *Cytogenet Genome Res* 2008;**121**:181–8.
37. Duponchel C, Djenouhat K, Frémeaux-Bacchi V, Monnier N, Drouet C, Tosi M. Functional analysis of splicing mutations and of an exon 2 polymorphic variant of SERPING1/C1NH. *Hum Mutat* 2006;**27**:295–6.
38. Andrejević S, Korosec P, Šilar M, Košnik M, Mijanović R, Bonaci-Nikolić B, et al. Hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency in Serbia: two novel mutations and evidence of genotype-phenotype association. *PLoS One* 2015;**10**: e0142174.
39. López-Lera A, Garrido S, Roche O, López-Trascasa M. SERPING1 mutations in 59 families with hereditary angioedema. *Mol Immunol* 2011;**49**:18–27.
40. Yamamoto T, Horiuchi T, Miyahara H, Yoshizawa S, Maehara J, Shono E, et al. Hereditary angioedema in Japan: genetic analysis of 13 unrelated cases. *Am J Med Sci* 2012;**343**:210–4.
41. Cagini N, Veronez CL, Constantino-Silva RN, Buzolin M, Martin RP, Grumach AS, et al. New mutations in SERPING1 gene of Brazilian patients with hereditary angioedema. *Biol Chem* 2016;**397**:337–44.
42. Kalmár L, Bors A, Farkas H, Vas S, Fandl B, Varga L, et al. Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema. *Hum Mutat* 2003;**22**:498.
43. Roche O, Blanch A, Duponchel C, Fontán G, Tosi M, López-Trascasa M. Hereditary angioedema: the mutation spectrum of SERPING1/C1NH in a large Spanish cohort. *Hum Mutat* 2005;**26**:135–44.
44. Grodecká L, Hujová P, Kramárek M, Kršjaková T, Kováčová T, Vondrášková K, et al. Systematic analysis of splicing defects in selected primary immunodeficiencies-related genes. *Clin Immunol* 2017;**180**:33–44.
45. Suffritti C, Zanichelli A, Maggioni L, Bonanni E, Cugno M, Cicardi M. High-molecular-weight kininogen cleavage correlates with disease states in the bradykinin-mediated angioedema due to hereditary C1-inhibitor deficiency. *Clin Exp Allergy* 2014;**44**:1503–14.
46. Colobran R, Lois S, de la Cruz X, Pujol-Borrell R, Hernández-González M, Guilarte M. Identification and characterization of a novel splice site mutation in the SERPING1 gene in a family with hereditary angioedema. *Clin Immunol* 2014;**150**:143–8.
47. Johnsrud I, Kulseth MA, Rødningen OK, Landrø L, Helsing P, Waage Nielsen E, et al. A nationwide study of Norwegian patients with hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency identified six novel mutations in SERPING1. *PLoS One* 2015;**10**:e0131637.
48. Sekijima Y, Hashimoto T, Kawachi Y, Koshihara H, Otsuka F, Ikeda S. A novel RNA splice site mutation in the C1 inhibitor gene of a patient with type I hereditary angioedema. *Intern Med* 2004;**43**:253–5.
49. Siddique Z, McPhaden AR, Lappin DF, Whaley K. An RNA splice site mutation in the C1-inhibitor gene causes type I hereditary angio-oedema. *Hum Genet* 1991;**88**:231–2.
50. Kawachi Y, Hibi T, Yamazaki S, Otsuka F. A novel donor splice site mutation in the C1 inhibitor gene of a patient with type I hereditary angioneurotic edema. *J Invest Dermatol* 1998;**110**:837–9.
51. Kesim B, Uyguner ZO, Gelincik A, Mete Gökmen N, Sin AZ, Karakaya G, et al. The Turkish Hereditary Angioedema Pilot Study (TURHAPS): the first Turkish series of hereditary angioedema. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;**156**:443–50.



## Deep Intronic *SERPING1* Gene Variants: Ending One Odyssey and Starting Another?

Anastasios E. Germenis<sup>1,2</sup> · Sofia Vatsiou<sup>1,2</sup> · Dorottya Csuka<sup>3</sup> · Maria Zamanakou<sup>2</sup> · Henriette Farkas<sup>3</sup>

Received: 19 March 2020 / Accepted: 4 October 2020  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

To the editor:

Hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency (C1-INH-HAE) is generally diagnosed on the basis of clinical and biochemical findings. However, *SERPING1* gene genotyping is required in certain special situations [1], while an accurate detection of the causative variant is essential for a successful prenatal or preimplantation diagnosis of C1-INH-HAE [2] as well as for a gene therapy to be considered [3]. Nevertheless, in 9.2% (from 3.8 to 17.9%) of C1-INH-HAE patients, the causal *SERPING1* gene variant remains unidentified by the use of current genetic testing approaches, which provide information restricted to the exons and exon-intron boundaries [4].

The increasing use of next-generation sequencing (NGS) targeting full genomic gene sequence has definitely changed the study of hereditary diseases and has raised awareness of the relevance of deep intronic variations (located more than 100 base pairs away from exon-intron junctions). Until 2017, 185 deep intronic variants across 77 different disease-associated genes had been reported [5]. Using a custom NGS platform targeting the entire *SERPING1* gene [6], we recently examined 14 unrelated C1-INH-HAE patients in whom conventional genotyping had failed to identify a causative variant in the coding region. In two of them, Greek in origin, we discovered a deep intronic variant (c.-22-155 G >

T) in the first intron of *SERPING1* gene [7] which was classified as pathogenic, according to ACMG-AMP 2015 guidelines [8]. Concomitantly, Hujová et al. [9] described in a Czech family another deep intronic variant (c.1029 + 384 A > G) located in the intron 6 of the *SERPING1* gene, and provided strong evidence for its pathogenicity.

Here, we report a new C1-INH-HAE case of Hungarian origin in the family of which the c.1029 + 384 A > G variant was detected by our custom NGS panel and was found segregated with the disease (Fig. 1). A 43-year-old female patient (III.3) has been followed up at the Hungarian Angioedema Reference Center since her age of 3 years, when the diagnosis of C1-INH-HAE type I was established. Her grandfather (I.2) had angioedema symptoms but he committed suicide at the age of 50; her mother (II.5) suffocated of laryngeal edema at the age of 23 in the yard of the hospital. Family screening was performed by complement testing among all available first-degree blood relatives. Two symptomatic (II.1 and II.3) and an asymptomatic (III.1) members of the family were newly diagnosed with hereditary C1-INH deficiency type I. All of them are followed up regularly (at least once a year) at our Center. HAE symptoms of patient II.1 were mild (six attacks during a 22-year observational period). He has received acute treatment with plasma-derived C1-INH during HAE attacks. Patients II.3, III.1, and III.2 were ranked in severe group as they have experienced in average more than 12 HAE attacks per year. In these cases, long-term prophylaxis was introduced. Demographics, clinical data, results of complement testing, and types of treatments are presented in Supplementary Table 1.

Comparing the *SERPING1* gene genotype of the patients of our Hungarian family with those of the Czech family reported by Hujová et al. [9], we found that, beyond the pathogenic c.1029 + 384 A > G variant, they also share the c.-21 T (rs28362944), c.1029 + 84 G (rs118132731) c.1030-20 G (rs2511988) haplotype. This finding indicates that the two families might be related to and originated from a common ancestor.

Taken together with our previous results [7], the above case escalates up to 20% the percentage of pathogenic deep

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10875-020-00887-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

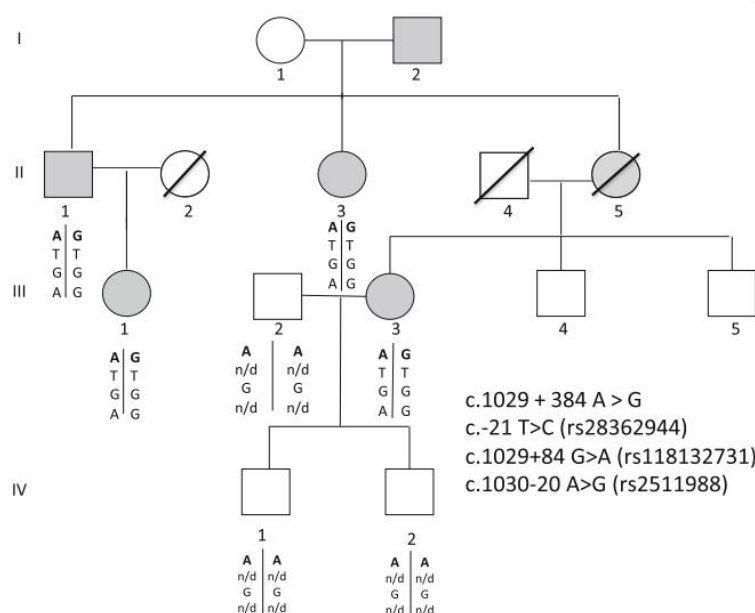
✉ Anastasios E. Germenis  
agemen@med.uth.gr

<sup>1</sup> Department of Immunology & Histocompatibility, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Thessaly, Panepistimiou 3, Biopolis, GR-41500 Larissa, Greece

<sup>2</sup> CeMIA SA, Larissa, Greece

<sup>3</sup> Hungarian Angioedema Reference Center, 3rd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

**Fig. 1** The analyzed family tree. All examined suffering members (II.1, II.3, III.1, III.3) but none of the examined healthy relatives (III.2, IV.1, IV.2) were carrying the deep intronic variant c.1029+384 A>G of the *SERPING1* gene. Nucleotides in positions c.1029+384 A>G, c.-21 T>C, c.1029+84 G>A, and c.1030-20 A>G are shown under all sequenced patients (n/d, not done)



intronic variants detected among C1-INH-HAE patients in whom no pathogenic variant was found after conventional *SERPING1* gene genotyping. This finding argues the prospect of the existence of other C1-INH-HAE-associated intronic variants imposing consequently the scrutiny of intronic regions in such cases. After that, searching for pathogenic deep intronic variants becomes also mandatory in the not uncommon C1-INH-HAE cases where conventional approaches uncover novel missense *SERPING1* gene variants, the pathogenicity of which is difficult to be confirmed. Beyond increasing the diagnostic mutation yield for C1-INH-HAE, the detection of pathogenic deep intronic variants is very important under the light of the great potential that antisense therapies present for this kind of variants. It must be noted, however, that even the most meticulous sequencing of all coding and noncoding regions of the gene could be unable to detect a pathogenic variant since regulatory motifs operating at great distances from the gene could be responsible for the disease.

However, searching of *SERPING1* gene in the deep intronic regions further complicates the already cumbersome conventional genotyping of C1-INH-HAE patients [9]. In addition, it must be mentioned here that, to this purpose, the usefulness of whole exome sequencing is limited since it usually disregards variants located in the deep intronic regions. Therefore, custom NGS panels targeting the entire *SERPING1* gene seem to be the golden method towards an efficient *SERPING1* gene deep intronic sequencing.

Nevertheless, the high degree of intronic variation makes the evaluation of the pathogenicity of deep intronic variants very demanding. First of all, possibly pathogenic variants identified on genomic level should be confirmed with functional RNA

testing. Several methods are available to this purpose, including the construction of minigenes, an in vitro hybrid system that allows for the gene to express itself in the same way as a wild-type gene fragment [10] as well as real-time PCR (RT-PCR) or quantitative PCR (qPCR) which allows to measure the quantity of each different transcript and compare with the wild-type [11]. Interestingly, Hujová et al. [9] propose a protocol for mRNA analysis including the use of peripheral blood mononuclear cells as an RNA source and capillary electrophoresis as a sensitive tool for low abundant transcript detection. As far as the usefulness of the in silico predictive algorithms is considered, those of them developed to predict splice site abnormalities, either exonic or intronic, present with a higher sensitivity (~90–100%) and specificity (~60–80%) compared with those predicting the impact of missense changes. Finally, the fact that intronic variations are not usually reported to public databases represents another barrier for the evaluation of their pathogenicity. Therefore, data sharing through open-source databases is considered to facilitate the interpretation of deep intronic variants identified by genetic testing.

In conclusion, the advent of genomic sequencing that allowed the detection of pathogenic deep intronic *SERPING1* gene variants seems to bring an end to the lengthy Odyssey of standard genotyping of at least a proportion of C1-INH-HAE patients, despite the fact that the special requirements to annotate these variants signify the beginning of a new Odyssey.

### Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical Approval** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

**Informed Consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

## References

- Gemenis AE, Margaglione M, Pesquero JB, Farkas H, Cichon S, Csuka D, et al. International consensus on the use of genetics in the management of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;8:901–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.10.004>.
- Farkas H, Martinez-Saguer I, Bork K, Bowen T, Craig T, Frank M, et al. International consensus on the diagnosis and management of pediatric patients with hereditary angioedema with C1 inhibitor deficiency. *Allergy.* 2017;72(2):300–13.
- Qiu T, Chiuchiolo MJ, Whaley AS, Russo AR, Sondhi D, Kaminsky SM, et al. Gene therapy for C1 esterase inhibitor deficiency in a murine model of hereditary angioedema. *Allergy.* 2019;74(6):1081–9.
- Speletas M, Szilagyí A, Psarros F, Moldovan D, Magerl M, Kompoti M, et al. Hereditary angioedema: molecular and clinical differences among European populations. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(2):570–3.
- Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet.* 2017;136(9):1093–111.
- Loules G, Zamanakou M, Parsopoulou F, Vatsiou S, Psarros F, Csuka D, et al. Targeted next-generation sequencing for the molecular diagnosis of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Gene.* 2018;667:76–82.
- Vatsiou S, Zamanakou M, Loules G, Psarros F, Parsopoulou F, Csuka D, et al. A novel deep intronic SERPING1 variant as a cause of hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Allergol Int.* 2020;S1323–8930(20)30003–4.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24.
- Hujová P, Souček P, Grodecká L, Grombířková H, Ravčuková B, Kuklínek P, et al. Deep intronic mutation in SERPING1 caused hereditary angioedema through pseudoexon activation. *J Clin Immunol.* 2020;40(3):435–46.
- Singh G, Cooper TA. Minigene reporter for identification and analysis of cis elements and trans factors affecting pre-mRNA splicing. *BioTechniques.* 2006;41(2):177–81.
- Deng J, Li D, Mei H, Tang L, Wang HF, Hu Y. Novel deep intronic mutation in the coagulation factor XIII a chain gene leading to unexpected RNA splicing in a patient with factor XIII deficiency. *BMC Med Genet.* 2020;21(1):9.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.