

Válaszok Prof. Dr. Raskó István, az MTA doktora bírálataira, kérdéseire

Mindenekelőtt nagyon köszönöm, hogy a Professzor Úr elvállalta disszertációm bírálatát és nagy alaposággal, gondolatébresztő elemzéssel értékelt azét. Külön köszönöm a biztató szavait, elismerését.

Professzor Úr megjegyzéseivel, kérdéseivel kapcsolatos válaszaim a következők:

- Zavaró az „arrythmogén” és „aritmogén” szavak keverése, míg az előbbi az angol nyelvű szakirodalom, utóbbi a magyar nyelvű irodalom „közzereplője”. Helyesebb lett volna a magyar változat használata.

Professzor Úr megjegyzésével teljesen egyetértek, valóban zavaró a két írásmód keveredése, és valóban helyesebb lett volna a magyar változat használata.

- Az értekezés címe túl általános, jobb lett volna „a familiáris aritmogén kardiológiai kórképek morfológiai genetikai klinikai vizsgálata” cím.

A választ Csanádi Zoltán Professzor Úr lényegében egyező kérdésére együtt adom meg.

Valóban, a disszertációban érintett kórképek közös jellemzője az aritmiákra való hajlam fokozott volta, és az is igaz, hogy a disszertáció három fejezete közül kettőben a tárgyalt eredmények közvetlenül, vagy közvetve kapcsolódnak a betegségek aritmogén jellegéhez. Fentiek alapján a disszertáció címében az 'aritmogén' szó jelzőként való használata teljes mértékben helyes lett volna. Mindazonáltal a disszertáció címválasztását ebben a szempontból az befolyásolta, hogy a disszertáció harmadik alfejezetében, a hypertrophiás cardiomyopathiában végzett alkoholos ablációval kapcsolatos vizsgálatokban nem a betegség aritmogén, hanem obstruktív jellegén volt a hangsúly, így az aritmogén szó címben való szerepeltetése nem reprezentálta volna a disszertáció egészét. Annak a két alfejezetnek a címében, ahol közvetlen kapcsolódás van a betegségek aritmogén jellegéhez, ott az aritmogén szó hangsúlyosan megjelenik.

- A bevezetésben szerintem említeni kellett volna a HCM fenokópiák közül az autoszómális domináns öröklődésű, az AMP kináz γ -alegységét kódoló PRKAG2 gén mutációja következtében kialakuló cardiális hypertrophiát, valamint három gyermekkori szindrómában (Pompe, Noonan, Friedreich ataxia) leírt bal kamra hypertrophiát.

Professzor Úrral teljesen egyetértek abban, hogy a HCM fenokópiák közül csak azon betegségeket (Danon betegség, Fabry betegség, transthyretin amyloidosis, mitochondriális

cardiomyopathia) tárgyaltam a Bevezetésben, melyekkel kapcsolatos kutatási eredmények a disszertáció részét képezték. Tekintettel arra, hogy még a Professzor Úr által említetteken kívül is számtalan HCM fenokópia ismert¹ [aminosav anyagcsere rendellenességhez társuló (pl. I. típusú tyrosinamia, dihydrolipoamid dehidrogenáz deficiencia, stb.); zsírsav anyagcsere rendellenességhez társuló (pl. nagyon hosszú láncú acyl Co-A dehidrogenáz deficiencia, malonil-CoA dekarboxiláz deficiencia, stb.); egyéb lizoszómális tárolási betegségekhez társuló (pl. Sly szindróma, I. típusú gangliozidózis, stb.); kardio-kután szindrómák vagy RASopátiákhoz társuló (pl. LEOPARD szindróma, Noonan szindróma, Costello szindróma, I. típusú neurofibromatózis, stb.); lipodisztrófiás szindrómákhoz társuló (pl. Berardinelli-Seip szindróma, Seip szindróma, stb.); neuromuszkuláris betegségekhez társuló (I és II típusú myofibrilláris myopátiák, nemalin myopátia 3, stb.)], az összes ilyen kórkép felsorolása meghaladta volna a disszertáció kereteit, szelektálni belőlük pedig önkényes lett volna.

-A Betegek és módszerek fejezet számos olyan táblázatot (1-4.) és ábrát (1,3-8.) tartalmaz, amelyeknek az Eredmények fejezetben lenne a helye, a III. Appendixben szereplő genetikai vizsgálatok részletes metodológiáját viszont itt szerepeltetném.

A választ Csanádi Zoltán Professzor Úr lényegében egyező kérdésére együtt adom meg.

A disszertáció megírásánál azt az elvet követtem, hogy amennyiben a genetikai vizsgálat, tehát egy adott genetikai mutáció azonosítása, a „genotipizálás” volt a vizsgálat célja egy adott betegben, vagy betegpopulációban (pl. *LAMP2* génmutációk azonosítása Danon betegség gyanúja esetén, vagy *TTR* génmutációk azonosítása transthyretin amyloidosis gyanúja esetén) akkor az adott beteg, vagy betegpopuláció klinikai jellemzőit a 'Betegek és Módszerek' fejezetben tárgyaltam, hiszen itt ők voltak a vizsgálat alanyai. Amennyiben egy adott genetikai mutáció vagy mutációk klinikai jellemzése, a „fenotipizálás” volt a vizsgálat célja (mint pl. családszűrési vizsgálatoknál) itt a korábban azonosított mutáció volt a kiindulási alap, az észlelt klinikai fenotípus pedig a vizsgálat eredménye, így utóbbi adatok kerültek az 'Eredmények' fejezetbe.

A disszertáció genetikai részeinek megírásánál az volt a vezérlő elv, hogy elsősorban a vizsgálatok és az eredmények közvetlen klinikai relevanciáját hangsúlyozzam és mutassam be, és ne a genetikai vizsgálatok módszertanát és technikáit. Ezért választottam azt a megoldást, hogy a részletes genetikai módszertant az Appendix-ben szerepeltettem, hogy az a teljesség igényével ott megtalálható legyen, viszont a témában kevésbé járatos olvasót ne akassza meg a disszertáció olvasásában.

- Az Andersen-Tawil szindrómában talált új kóroki *KCNJ2* génmutáció funkcionális szerepének bizonyítása kár, hogy appendixként szerepel, miután szerintem ez az értekezés egyik legértékesebb genetikai története és az Eredmények fejezetbe tettem volna.

Teljesen egyetértek Professzor Úrral abban, hogy egy új kóroki mutáció funkcionális vizsgálata a genetikai kutatómunka legizgalmasabb kihívásai közé tartozik, hiszen alapvető patomechanizmusok feltárása válik ezáltal lehetővé. Az előző megjegyzésre adott válaszhoz hasonlóan itt is azt hoznám fel magyarázatként, hogy a disszertációban a közvetlen klinikai relevanciákra és nem vizsgálatok esetleges alapkutatási kapcsolódási pontjaira szerettem volna helyezni a hangsúlyt, ezért került az adott munka klinikai része a disszertáció fő szövegtörzsébe, az alapkutatót megtestesítő funkcionális vizsgálat pedig az Appendix-be. Természetesen tisztában vagyunk az általunk azonosított mutációk funkcionális vizsgálatának jelentőségével és abban a szerencsés helyzetben is vagyunk, hogy az SZTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetével, Prof. Varró Andrással és Dr. Ördög Balázssal kollaborációban van lehetőségünk funkcionális vizsgálatokat végezni ioncsatorna mutációk esetén. Utóbbira jó példa, hogy hat Andersen-Tawil szindrómában szenvedő betegünkben azonosított három novel *KCNJ2* mutáció esetén is (Val302del, Glu293Lys, Met307Ile) végeztünk funkcionális vizsgálatot, melyek közül a disszertációban tárgyalt Val302del mutáción túl a Glu293Lys mutációval kapcsolatos egyedi észlelésünk jelenleg publikálás alatt van (Déri Sz, Borbás J, Hartai T, Hategan L, Csányi B, Visnyovszky Á, Madácsy T, Maléth J, Hegedűs Z, Nagy I, Labro AJ, Forster T, Varró A, Sepp R, Ördög B. The intersubunit salt bridge network identified by the novel Andersen-Tawil Syndrome *KCNJ2* variant p.Glu293Lys maintains conductivity of Kir2.1 channels. Cardiovascular Research, under review).

- A Megbeszélés fejezetből hiányolom a genetikai alapú therápiás lehetőségek felsorolását cardiomyopathiákban. A 21. századi orvostudomány bizonyos szakterületein, elsősorban az onkológiában a tumorok genetikai mintázata alapján egyénre szabott therápiát alkalmaznak. Ezt a precíziós medicinaként ismert koncepciót Obama elnök az USA egészségügyi ellátásának középpontjába emelte. Az elsősorban genetikai etiológiájú cardiovascularis betegségek, mint a cardiomyopathiák, az öröklődő szívritmuszavarok, mint a hosszú QT és Brugada szindróma, a familiáris hyperlipidémia, valamint a Marfan szindróma azok a célbetegségek, melyek az egyénre szabott gyógyítás következő célpontjai lehetnek. Például, meg kellett volna említeni Ho és mtsai közleményét (JACC Heart Fail 3(2) 180,2015) amelyben kimutatták a diltiazem jótékony hatását bal kamrai hypertrophia nélküli MYBPC3 mutáció hordozókban, Mearini (Nat Comm 5:5515,2014) sikeres génterápiás beavatkozását

adenoasszociált vírus vektor felhasználásával MYBPC3 mutációt hordozó egérmodellben, a génszerkesztés módszerének lehetséges alkalmazását a HCM kezelésében és ennek során a számos etikai kérdést felvető humán embriókban végzett géncorrekciót (Ma et al Nature 548:413,2017).

Valóban számos, különböző támadáspontú genetikai alapú, potenciális terápiás lehetőségét felvető kutatási eredmény vált ismertté a közelmúltban. A *MYBPC3* mutációk által okozott hypertrophiás cardiomyopathiát véve példaként, A Professzor Úr által is említett, CRISPR–Cas9 alapú, preimplantációs humán embriókban közölt géncorrekción ('genome editing') alapuló eljárásnál² egyéb genetikai támadáspontokat is azonosítottak. *MYBPC3* génmutációk esetében már vizsgált potenciális génterápiás lehetőség a mutáns pre-mRNS modifikálása az ún. 'exon skipping' vagy 'trans-splicing' útján. 'Exon skipping' esetén antiszensz oligonukleotidokat (AON) használnak, mely exonikus splicing enhancer szekvenciákat utánoz, mely a splicing-ot végző komplexus kötődését tudja szabályozni, mely által tetszőleges exonok eliminálása érhető el a mRNS-ből. Utóbbi esetben az adott exon hiányozni fog az mRNS-ből, és az átíródó fehérjéből. Így az átíródott fehérje rövidebb lesz ugyan, de az átíródási keret megtartott lesz és potenciálisan funkcionális fehérje fog képződni. Ezt a mechanizmust *Mybpc3* knock-in transzgén egérben tesztelték már, adeno-asszociált vírussal bejuttatott, az 5-ös és 6-os exonokra specifikus 'exon skipping'-gel, mely újszülött egerekben megelőzte a mind a diasztolés diszfunkció, mind a bal kamra hypertrophia kialakulását.³ A humán *MYBPC3* gén esetén 6 egyes vagy 5 dupla exon is 'skip'-elhető, a rövidebb cMyBP-C fehérje még így is tartalmazná a funkcionálisan fontos foszforilációs és interakciós helyeket. Ezzel e megközelítéssel a *MYBPC3* gént érintő mutációk kb. felét lehetne „kezelní”.⁴ A spliceoszóma mediált RNS trans-splicing-gal is vannak tapasztalatok, *Mybpc3* knock-in transzgén egerekből származó cardiomyocytákból, de a módszer hatékonysága alacsonynak bizonyult, és a kijavított fehérje mennyisége nem volt elégséges a HCM fenotípus kialakulásának megelőzésére.⁵ Végezetül a teljes hosszúságú *Mybpc3* gén transzferével ("gene replacement") is vannak tapasztalatok. Utóbbi módszer dózis dependens módon megelőzi a szívhypertrophia és diasztolés diszfunkció kialakulását *Mybpc3* knock-in egerekben.⁶

Ioncsatorna betegségek esetén cardiomyocytá irányba differenciált, indukált pluripotens őssejtek (iPSC-CMs) használatával kapcsolatban van a legtöbb kutatási adat. Ezek részben egy adott mutációt hordozó betegben modell rendszerként tudnak információt nyújtani az adott mutáció pontos patomechanizmusáról, ill. individualizált farmakológiai és/vagy molekuláris terápiás beavatkozások tesztelésére szolgálhatnak. Utóbbi módszert sikeresen alkalmazták

Ala614Val mutációhordozó LQT2 betegből származó iPSC-CM-ben, ahol a K_{ATP} -csatorna nyitó pinacidil, ill. a Ca^{++} csatorna blokkoló nifedipine akciós potenciál rövidítő és aritmia szuppresszálo hatását tudták kimutatni.⁷ LQT3 iPSC-CM-ben a mutáns *SCN5A* Na^+ csatorna által okozott fokozott Na^+ áram és megnyúlt akciós potenciál tartam csökkentését sikerült igazolni mexiletin hatására.⁸ LQT8 iPSC-CM-ben a mutáns Cav1.2 Ca^{++} csatorna által előidézett csökkent csatorna inaktivációt lehetett szuppresszálni az új Ca^{++} csatorna blokkoló roscovitin-nel.⁹ Matsa és mtsai adatai alapján allél-specifikus RNS-interferenciával az LQT2 fenotípus normalizálható volt.¹⁰ A sejtmembránba való transzport gátlását okozó 'trafficking' mutációt modelláló LQT2 iPSC-CM-ben Mehta és mtsai a proteoszóma inhibitor ALLN alkalmazásával a hERG transzport helyreállítását és az akciós potenciál tartam következményes normalizálását tudták demonstrálni.¹¹

Fenti adatok jól demonstrálják a gén- és mutáció specifikus terápiák, ill. a genetikai terápiák alkalmazhatóságának potenciálját örökletes kardiológiai kórképekben. Arra való tekintettel, hogy fenti terápiák közvetlen klinikai alkalmazhatósága még távolinak tűnik, a téma rendkívüli izgalmassága ellenére, a disszertációban fenti adatokat korainak tartottam volna diszkutálni.

- A cardiomyopathiák genetikai vizsgálata még a kezdeteknél tart, ezért a fejezet végéről hiányolok egy olyan összegzést, amely ismertetné a genetikai vizsgálatok klinikai jelentőségét. Említeni kellett volna a genetikai tanácsadás jelentőségét a mutáció hordozók családalapításában, ugyanis jelenleg a kóros fenotípusok és a mutáció továbbadása megelőzésének egyetlen módja, hogy azoknál a családoknál, ahol az egyik partner mutáció hordozó preimplantációs genetikai diagnózis történjen.

Teljesen igazat adok Professzor Úrnak abban, hogy érdemes lett volna a disszertációban az örökletes kardiológiai kórképekkel kapcsolatos genetikai vizsgálatok és családszűrés témakörét érinteni. Utóbbi különösen relevánsnak látszik annak a fényében, hogy fenti témákról vezető kardiológusok társaságok (American Heart Association, American College of Cardiology, European Society of Cardiology) is már klinikai útmutatók szintjén foglalkoznak.¹²⁻¹⁴

Az örökletes kardiológiai kórképekben végzett genetikai vizsgálat diagnosztikai jelentőségére való tekintettel, a Heart Rhythm Society és a European Heart Rhythm Association 2011-es ajánlása szerint a legtöbb cardiomyopathia és ioncsatorna féleségben a genetikai tanácsadás, a családtagok szűrővizsgálata és a genetikai vizsgálat elvégzése javasolt (I. osztályú ajánlás).^{1, 12} Amennyiben a betegség nem magyarázható egyértelműen nem-genetikai okokkal, minden cardiomyopathiás beteg esetén genetikai tanácsadás javasolt. Lehetőség szerint genetikai

vizsgálat ajánlott a hozzátartozók kaszkádszerű genetikai szűrésére. A genetikai vizsgálatnak ki kell terjednie a leggyakrabban szerepet játszó kóroki génekre (pl. hypertrophiás cardiomyopathia esetén a sarcomer proteint kódoló, vagy arrhythmogén jobb kamrai cardiomyopathia esetén a dezmoszóma fehérjéket kódoló génekre). Nem egyértelmű klinikai diagnózis esetén (pl. sportolók esetén) szakértő team által koordinált genetikai vizsgálat csakis a részletes klinikai vizsgálatok elvégzése után jön szóba. A post-mortem szövetminták vagy DNS-minták genetikai vizsgálata értékes lehet az élő rokonok számára.

Ha egy cardiomyopathiás betegben definitív kóroki genetikai mutációt azonosítanak, a hozzátartozókat előzetes felvilágosítás alapján mind klinikai, mind genetikai vizsgálatnak kell alávetni, és felmérni, hogy hordozzák-e ugyanazt a mutációt, és klinikailag érintettek-e. Ha a mutáció nincs jelen, utánkövetésük nem szükséges, de tünetek jelentkezése esetén újabb vizsgálat válhat szükségessé. Amennyiben nem történik genetikai vizsgálat a probandban, vagy az nem igazol definitív mutációt, illetve egy vagy több ismeretlen jelentőségű genetikai variánst talál, az első ági felnőtt hozzátartozóknak fel kell ajánlani a klinikai szűrés lehetőségét (EKG, echokardiogram). Ha ezeken nem látható eltérés, az életkortól, a családban előforduló cardiomyopathia súlyosságától és az aktív versenysport-részvételtől függő rendszeres időközönként fel kell ajánlani nekik az újbóli állapotfelmérést. Azoknál, akik a betegség korai stádiumának megfelelő nem diagnosztikus tüneteket mutatnak, eleinte 6-12 hónapos időközönként, majd ritkábban kell kontrollon jelentkezniük, amennyiben a tünetek nem progrediálnak. Minden, újkeletű kardiovaszkuláris tünettől jelentkező hozzátartozó állapotát azonnal újra fel kell mérni.

A genetikai diagnózis különös fontos a cardiomyopathia fenokópiákban (pl. Danon betegség, transthyretin amyloidosis, Fabry betegség) ahol a pontos kórisme speciális terápiás eljárásokat indikálhat. Jó példa erre a *GLA* génmutációk által okozott, az alfa-galaktozidáz enzim defektusához vezető Fabry betegség, mely egyes eseteiben csak szívspecifikus, hipertrófiás cardiomyopathia képében megjelenő eltérést látunk. A Fabry betegségben alkalmazott enzimpótló terápia megállíthatja, lelassíthatja a betegség progresszióját, így a specifikus diagnózis specifikus terápia indítását alapozza meg. Hasonló mondható el a Danon betegségről, mely a *LAMP2* génmutációk által okozott, hipertrófiás cardiomyopathia, vázizom disztrófia és mentális retardáció formájában megjelenő, X-kromoszómához kötött kórkép. Danon betegségben nagyon gyors a betegség progressziója, és az érintett fiúbetegek életük harmadik évtizedében progresszív szívelégtelenség következtében meghalnak. Amennyiben ismert -a jórészt csak genetikai alapon felállítható- pontos diagnózis, korán fel kell vetni a

szívtranszplantáció lehetőségét, mely az egyetlen effektív terápiás modalitás a betegek túlélése szempontjából.

Kérdések:

- Kimutatható-e valamilyen összefüggés a mutáció típusa és a hisztopathológiai kép között a HCM-es betegeknél?

Fenti kérdés pontos megválaszolására nincsen a szakirodalomban elérhető egyértelmű, nagy esetszámú vizsgálaton alapuló adat. Tekintettel a HCM viszonylag alacsony mortalitására (kb. 1-1.5%/év) a kérdésre pontos választ adó, hisztológiai elemzést is tartalmazó vizsgálat nehezen lenne is tervezhető. Egy kis esetszámú vizsgálat alapján arra van adat, hogy a troponin T mutációhordozókban kisebb szív súly, kisebb mértékű fibrózis és nagyobb kiterjedtségű myofiber disarray észlelhető. Varnava és mtsai. kilenc HCM beteg szívét, kikben a későbbiekben troponin T mutációt azonosítottak, hasonlítottak össze 41 troponin T mutációt nem hordozó beteg szívével. A troponin T mutációhordozó betegeknél kisebb volt a szív súly (380.3±105.4 v. 585.0±245.7 g, P=0.002), kisebb volt a fibrózis mértéke (0.7±0.4% v. 2.6±2.8%, P=0.001), és nagyobb myofiber disarray mértéke (46.2±7.2% v. 24.1±15.9%, P<0.0001). Hasonlóképpen, azokban a troponin T mutációhordozó betegeknél, kik hirtelen szívhalált haltak, kisebb volt a szív súly (429.8±75.4 v. 559.6±204.43 g, P=0.04) és nagyobb a myofiber disarray mértéke (40.1±9.4% v. 20.2±12.6%, P=0.002), a troponin T mutáció negatív, hirtelen szívhalál halt betegeknél összehasonlítva.¹⁵

Tekintettel arra, hogy a HCM hisztopatológiai megjelenése myocyt hypertrophia, myofiber disarray, interstitialis fibrózis és kísér betegség formájában HCM-ben meglehetősen uniformis, és patológiai tanulmányok nem különítették el külön hisztopatológiai alcsoportokat, egy közvetlen, klinikailag relevánsnak tűnő genotípus-fenotípus összefüggés a hisztológiai kép között nem látszik valószínűnek. Ezt a feltételezést látszanak támogatni a HCM szöveti karakterizálásáról indirekt információkat szolgáltató MRI adatok. Bár statisztikailag kimutathatók bizonyos különbségek amennyiben a genotipizált betegeket nagy csoportokra, mint pl. szarkomer génmutációt hordozó vs. szarkomer génmutációt nem hordozó,¹⁶ vagy vékony filamentumot vs. vastag filamentumot érintő génmutációt hordozó csoportokat vizsgálunk,¹⁷ adott géneket érintő mutációk klinikai vagy morfológiai megjelenése között nem látszik lényegi különbség. Ötvenhárom béta-myozin nehéz lánc gén mutációhordozó és 75 myozin kötő C fehérje gén mutációhordozó beteg MRI vizsgálata azt mutatta, hogy

betegcsoportok között nincs különbség a bal kamrai térfogatok, bal kamra tömeg, maximális bal kamra fal vastagság, bal kamra morfológia, bal pitvari térfogat és mitrális billentyű hossz tekintetében. Fentiekhez hasonlóan nem volt különbség a gadolinium késői kontraszt (LGE) előfordulási gyakorisága (65% v. 64%; P=0.99) ill. a bal kamrai izomtömegre vonatkoztatott LGE kiterjedtség (10.4±13.2% v. 8.5±8.5%; P=0.44) között.¹⁸ Hasonló eredményt mutatott Ellims és mtsai. vizsgálata akik 17 *MYBPC3* gén mutáció hordozó és 11 *MYH7* génmutáció hordozó beteget összehasonlítva nem észleltek szignifikáns különbséget MRI-vel meghatározott bal kamrai dimenziók, volumenek, maximális bal kamra fal vastagság és LGE kiterjedtség között.¹⁹ Egy nemrég közölt meta-analízis sem talált lényegi különbséget a két legfontosabb gént, a *MYBPC3* és *MYH7* gént érintő mutációhordozók klinikai megjelenését, köztük a bal kamra hypertrophia mértékét illetően.²⁰

- A már közölt HCN4 mutációk egymástól különböző klinikai fenotípusok kialakításában szerepelnek (familiáris bradycardia, atrioventriculáris blokk, pitvarfibrilláció, Brugada szindróma, hosszú QT szindróma, bal kamrai cardiomyopathia, aorta dilatáció) ismert-e hogy a fenotípusok a mutáció helyével mutatnak-e összefüggést?

The HCN4 csatorna α -alegysége hat transzmembrán szegmensből (S1–S6), a pórus formáló hurokból (P) az S5 és S6 transzmembrán szegmens között és az intracelluláris N- és C-terminális részből áll. A csatorna feszültség szenzorát a pozitív töltésű S4 helix alkotja. A C terminuson helyezkedik el a C-linker és a ciklikus nukleotid-kötő domén (cyclic nucleotide-binding domain, cNBD), mely a HCN csatorna kapuzásában mediálja a ciklikus AMP (cAMP) szint változásait.

Az szakirodalomban eddig közölt mutációk a *HCN4* gén bármely részét érinthetik, és egyértelmű összefüggés a mutáció lokalizációja és létrehozott fenotípus között nincsen. Természetesen, a közölt mutációk kis száma nehezíti bármiféle szignifikáns összefüggés kimutatását. Fontos hangsúlyozni, hogy a *HCN4* génmutációk következtében kialakuló fenotípusok nem élesen elkülönülten, hanem átfedő módon, adott esetben komplex fenotípusokat kialakítva, esetlegesen időben elkülönülve jelennek meg. Az időbeli elkülönésre jó példa a familiáris bradycardiában szenvedő betegek 40 éves kora után nagyobb arányban kialakuló pitvarfibrilláció, mely családokban egyes családtagokban a bradycardia, míg más családtagokban pitvarfibrilláció észlelhető. A komplex fenotípusok megjelenésére példa a bradycardia és a non-compact cardiomyopathia (LVNC), esetlegesen aorta dilatáció társulása,²¹⁻²³ de itt is érdemes hangsúlyozni, hogy az egyes fenotípusos jellegek nem mutattak

teljes kapcsoltságot és más génvariánsok is, mint pl. az ismeretlen cardiomyopathia kóroki géneként azonosított cysteine and glycine-rich protein 3 (*CSRP3*) gén gyakori W4R variánsa kimutathatók voltak egyes családtagokban a bradycardia és non-compact cardiomyopathia társulása esetén.²¹

A HCN4 csatorna bármely részét érintő mutációk által kialakított fenotípusok része a sinus bradycardia vagy sinus csomó diszfunkció, az egyetlen kivételt a csatorna C-terminális részét érintő G1097W mutáció jelenti, mely AV blokk formájában nyilvánult meg, és nem vezetett sinus csomó diszfunkcióhoz.²⁴ A sinus bradycardia és LVNC társulását akár az S4-S5 közötti linkert (A414G),²² akár a pórus régiót (Y481H, G482R),^{22, 23} akár a CNBD-t (695X),^{21, 25} akár az N-terminális régiót érintő mutációk kapcsán közölték (P883R).²¹ A Brugada szindrómával,²⁶ a fent említett AV blokkal,²⁴ ill. a QT megnyúlással való társulásról²⁷ egyedi esetleírások vannak csak, melyek általánosíthatósága kérdéses.

- Az értekezésben vizsgált családok tagjai ugyanazon mutáció mellett eltérő fenotípust mutatnak. Melyek lehetnek azok az egyéb genetikai, vagy epigenetikai faktorok amelyek az aritmogén kórképek kóroki mutációi által okozott fenotípust pozitív, vagy negatív irányban befolyásolják?

Egyre több adat támasztja alá azt a megfigyelést, hogy a klasszikus monogénes, Mendeli betegségek és a genetikailag komplex, poligénes betegségek közötti határvonal nem éles, és a két betegségmodell között egy jelentős átfedés észlelhető. Monogénes betegségek, mint pl. a HCM esetén a döntő faktor a primer génmutáció által létrehozott morfológiai/funkcionális károsodás. Amennyiben ez domináló, erős hatású (pl. a fehérje alapvető fontosságú strukturális/funkcionális részt érinti), a betegség magas penetranciával, korai életkorban, súlyos formában fog manifesztálódni. Amennyiben a primer mutáció hatása nem ennyire drámai, a betegség a komplex betegségek megjelenéséhez fog közelíteni, és egyéb genetikai tényezők ill. környezeti hatások befolyása válik meghatározóvá.

A HCM pathogenezisében számos, a kóroki HCM gének és génmutációk sokféleségét jól tükröző többféle mechanizmus szerepel.²⁸ A HCM kialakulásában 4, egymással szorosan kapcsolódó mechanizmus vesz részt. A primer defektus a genetikai mutáció. A elsődleges, vagy proximális fenotípus a sarcomer azon strukturális vagy funkcionális eltérése, melyet a mutáció közvetlenül hoz létre. Az intermedier vagy szekunder fenotípus azokat a molekuláris elváltozásokat foglalja magába melyek a sarcomer struktúra vagy funkció károsodása

következtében jönnek létre. Utóbbira a megváltozott génexpressziós mintázat és a szignalizációs utak, mint pl. a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), és transforming growth faktor β (TGFB1) utak aktiválódása a példa.²⁹ A harmadlagos hatások a következményesen létrejövő szövettani és patológiai fenotípusok, melyek pl. a fibrózis és hypertrophia kifejeződéséért felelős szignalizációs utak aktiválódását érintik. Ezek a molekuláris és hisztológiai elváltozások jelennek meg a HCM klinikai, negyedleges fenotípusában.

Fenti morfológiai, szövettani és klinikai HCM fenotípusok kialakulása számos meghatározó tényező közötti komplex interakció eredője. Bár a kóroki mutáció természetesen a fenotípus meghatározó tényezője, a szövettani és klinikai fenotípus kialakításában hasonlóképpen meghatározó lehet a szívizom hypertrophia és fibrózis létrejöttében szereplő mechanizmusok genetikai determináltsága, valamint olyan epigenetikai faktorok, mint pl. a nem-kódoló RNS-ek hatása, poszt-transzlációs modifikáció, kromatin és DNS modifikációk szerepe.²⁸ Ennek megfelelően a HCM harmadlagos és negyedleges fenotípusának kifejeződése már a komplex öröklődésű betegségek megjelenéséhez hasonlít. Fenti komplexitás ennek megfelelően nemcsak a különböző kóroki mutációkat hordozó egyedi HCM betegeket érinti, hanem ugyanazon mutációt hordozó egyazon család tagjait is.

A HCM morfológiai és klinikai variabilitása háttérében álló genetikai tényezőkre számos példát lehet hozni. Ismert, hogy nemcsak egy, hanem több sarcomer génmutációt hordozó (compound vagy dupla heterozigóták) HCM betegekben súlyosabb formában, korábbi életkorban jelenik meg a betegség.³⁰⁻³¹ Adatok utalnak arra is, hogy még ha ezek az addicionális genetikai variánsok nem is tarthatók kóroki mutációnak önmagukban, a szarkomer génvariánsok ismert alacsony funkcionális tolerabilitása miatt feltehetően jelentős genetikai modifikátor tényezőként szerepelhetnek. Ismertek olyan közlések is, melyek nem szarkomer, hanem pl. a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszert kódoló gének variánsainak szerepét, mint genetikai modifikátorokét valószínűsítették HCM-ban. Ortlepp és mtsai egy *MYBPC3* mutációt hordozó HCM-es család 26 családtagjának vizsgálatakor azt találták, hogy a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszert kódoló génpolimorfizmusok hatással voltak a bal kamra hypertrophia mértékére és penetranciájára az egyes családtagokban.³² Perkins és mtsai öt különböző renin-angiotenzin-aldoszteron rendszert kódoló génpolimorfizmust vizsgáltak 8 szarkomer/myofilament génre genotipizált 389 HCM betegben. Azt találták, hogy a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer génpolimorfizmusai nem random, hanem gén-specifikus módon befolyásolták a HCM klinikai fenotípusát, ahol a ACE gén deléció/deléció genotípusa csak a *MYBPC3* kóroki génmutációt hordozókban súlyosbította a bal kamra hypertrophiát.³³

Egy dél-indiai HCM kohorszban Rangarju és mtsai közlése szerint az ACE, hő-shock fehérje, és TNF-alfa gének variánsai nagyobb bal kamra hypertrophiával, megnövekedett bal kamra kifolyótraktus obstrukcióval és súlyosabb klinikai tünetekkel társultak.³⁴ Wang és mtsai kínai HCM betegekben végzett vizsgálata szerint az ACE 2 gén rs2106809 polimorfizmusa korrelált a bal kamra hypertrophia mértékével férfi betegekben.³⁵ Brugada és mtsai az endothelin-1 gén variáns és a megnövekedett bal kamra hypertrophia közötti kapcsolatról számoltak be HCM betegekben.³⁶ Mivel a HCM gyakoribb férfiakban, Lind és mtsai sex hormon receptorok genetikai variabilitását vizsgálták és igazolták, hogy az androgén receptor genetikai variánsa hatással van a bal kamra hypertrophia mértékére férfi HCM betegekben.³⁷ Fentiekén túl, az ismeretlen TNF- α túlprodukcióhoz vezető ritka TNF- α -308G/A polimorfizmus nagyobb bal kamrai izomtömeggel és a betegség korábbi megjelenésével társult HCM-es betegekben.³⁸ Fenti, kandidáns-gén megközelítésű vizsgálatokon túl genome-wide asszociációs vizsgálatok (GWAS) 153 különböző genotípusú HCM betegben pl. a *FHOD3* (formin homology 2 domain containing 3) gén lehetséges modifikátor szerepét vetették fel.

Még érdekesebb a lehetséges környezeti faktorok szerepe, mely kitűnően tanulmányozható az „alapító” („founder”) mutációval rendelkező betegpopulációkon, hiszen itt nemcsak az adott mutáció, hanem a mutáció körüli genetikai környezet is nagy valószínűséggel hasonló vagy azonos. Egy nemégi, 2016-os közleményükben Claes és mtsai 14 HCM család 38 családtagját vizsgálták, kik egy „founder” *MYL2* p.Glu22Lys mutációt és közös haplotípust hordoztak. A mutáció önmagában egy benignus betegséget okozott, alacsony penetranciával. Amennyiben egy addicionális hypertrophia rizikófaktor, mint pl. hipertenzió, obezitás, vagy egyéb sarcomer gén variáns volt jelen, a HCM kialakulásának esélye jelentősen megnőtt és a mutációhordozók 89%-ban manifesztálódott. Ebben a tekintetben a hipertenzió volt a legprominensebb rizikófaktor, mely a HCM-es mutációhordozók 71%-ban volt kimutatható. Fenti megfigyelések legalább részleges magyarázatot nyújtanak az azonos mutációt hordozó betegek klinikai fenotípusának heterogenitására.

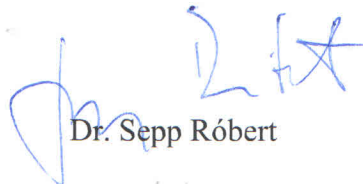
- Ismert e a perkután transzluminális septalis myocardium ablatio sikerességének valamilyen genetikai mintázathoz köthető prediktora?

Fenti kérdés megválaszolását illetően egyértelmű vizsgálat nem áll rendelkezésre a szakirodalomban, a perkután transzluminális septalis myocardium ablatio (PTSMA) sikerességének genetikai mintázathoz köthető prediktoraikat nem vizsgálták még. A PTSMA után közvetlenül észlelt gradiens csökkenés, valamint a létrejövő CK emelkedés csúcsértéke az egy

éves utánkövetéskor észlelt hemodinamikai siker független prediktorai voltak egy korai vizsgálatban. A Mayo Klinikáról származó nemrégii vizsgálat szerint az idősebb életkor (>65 év), alacsonyabb LVOT gradiens (<100 Hgmm), kevésbé súlyos septalis hypertrophia (≤ 18 mm) és kisebb bal pitvari átmérő (<40 mm) voltak a hosszú távú klinikai sikeresség prediktorai.³⁹⁻⁴⁰ Az operátor gyakorlata (>50 elvégzett beavatkozás) hasonlóképpen a tünetmentes túlélés független prediktora volt. A mitrális billentyű vagy a septum morfológiája, a beadott alkohol mennyisége, a kezelt erek száma, vagy a septalis ág átmérője nem mutatott összefüggést a klinikai kimenetellel. Ezekben az analízisekben a betegcsoport genotípusát nem vizsgálták.

Ismételten köszönöm Professzor Úrnak, hogy elvállalta MTA doktori értekezésem bírálatát, annak alapos átnézésére, értékelésére időt és energiát fordított. Bízom abban, hogy Professzor Úr válaszaikat megfelelőnek, szakmailag megalapozottnak találja, s továbbra is javasolja az értekezés nyilvános vitára bocsátását.

Szeged, 2018. augusztus 13.



Dr. Sepp Róbert

Referenciák

1. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2014;35:2733-2779.
2. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, Koski A, Ji D, Hayama T, Ahmed R, Darby H, Van Dyken C, Li Y, Kang E, Park AR, Kim D, Kim ST, Gong J, Gu Y, Xu X, Battaglia D, Krieg SA, Lee DM, Wu DH, Wolf DP, Heitner SB, Belmonte JCI, Amato P, Kim JS, Kaul S, Mitalipov S (2017) Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 548:413–419.
3. Gedicke-Hornung C, Behrens-Gawlik V, Reischmann S, Geertz B, Stimpel D, Weinberger F, Schlossarek S, Precigout G, Braren I, Eschenhagen T, Mearini G, Lorain S, Voit T, Dreyfus PA, Garcia L, Carrier L (2013) Rescue of cardiomyopathy through U7snRNA-mediated exon skipping in Mybpc3-targeted knock-in mice. *EMBO Mol Med* 5:1128–1145.
4. Carrier L, Mearini G, Stathopoulou K, Cuello F. Cardiac myosin-binding protein C (MYBPC3) in cardiac pathophysiology. *Gene* 573 (2015) 188–197.
5. Mearini G, Stimpel D, Kramer E, Geertz B, Braren I, Gedicke-Hornung C, Precigout G, Muller OJ, Katus HA, Eschenhagen T, Voit T, Garcia L, Lorain S, Carrier L (2013) Repair of Mybpc3 mRNA by 5'-trans-splicing in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2:e102.
6. Mearini G, Stimpel D, Geertz B, Weinberger F, Krämer E, Schlossarek S, Mourot-Filiatre J, Stöhr A, Dutsch A, Wijnker PJM, Braren I, Katus HA, Müller OJ, Voit T, Eschenhagen T, Carrier L (2014) Mybpc3 gene therapy for neonatal cardiomyopathy enables longterm disease prevention in mice. *Nat Commun* 5:5515.
7. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells, *Nature* 471 (2011) 225–229.
8. Ma D, Wei H, Zhao Y, et al. Modeling type 3 long QT syndrome with cardiomyocytes derived from patient-specific induced pluripotent stem cells, *Int. J. Cardiol.* 168 (2013) 5277–5286.
9. Yazawa M, Hsueh B, Jia X, et al. Using induced pluripotent stemcells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome, *Nature* 471 (2011) 230–234.
10. Matsa E, Dixon JE, Medway C, et al. Allele-specific RNA interference rescues the long-QT syndrome phenotype in human-induced pluripotency stem cell cardiomyocytes, *Eur. Heart J.* 35 (2014) 1078–1087.
11. Mehta A, Sequiera GL, Ramachandra CJ, et al. Re-trafficking of hERG reverses long QT syndrome 2 phenotype in human iPS-derived cardiomyocytes, *Cardiovasc. Res.* 102 (2014) 497–506.
12. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S et al. HRS/EHRA Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies. *Heart Rhythm* 2011; 8:1308 – 1339.

13. Priori SG, Wilde AA, Horie M, et al. Executive summary: HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Heart Rhythm* 2013; 10:e85-108.
14. Charron P, Arad M, Arbustini E, et al. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal* 2010; 31, 2715–2728.
15. Varnava AM, Elliott PM, Baboonian C, Davison F, Davies MJ, McKenna WJ. Hypertrophic cardiomyopathy: histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease. *Circulation*. 2001;104(12):1380-4.
16. Rubinshtein R, Glockner JF, Ommen SR, Araoz PA, Ackerman MJ, Sorajja P, Bos JM, Tajik AJ, Valeti US, Nishimura RA, Gersh BJ. Characteristics and clinical significance of late gadolinium enhancement by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2010; 3:51–58.
17. Coppini R, Ho CY, Ashley E, Day S, Ferrantini C, Girolami F, Tomberli B, Bardi S, Torricelli F, Cecchi F, Mugelli A, Poggesi C, Tardiff J, Olivetto I. Clinical phenotype and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with thin-filament gene mutations. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64:2589–2600.
18. Weissler-Snir A, Hindieh W, Gruner C, Fourey D, Appelbaum E, Rowin E, Care M, Lesser JR, Haas TS, Udelson JE, Manning WJ, Olivetto I, Tomberli B, Maron BJ, Maron MS, Crean AM, Rakowski H, Chan RH. Lack of Phenotypic Differences by Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in MYH7 (β -Myosin Heavy Chain)- Versus MYBPC3 (Myosin-Binding Protein C)-Related Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017 Feb;10(2). pii: e005311. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.116.005311.
19. Ellims AH, Iles LM, Ling LH, Chong B, Macciocca I, Slavin GS, Hare JL, Kaye DM, Marasco SF, McLean CA, James PA, du Sart D, Taylor AJ. A comprehensive evaluation of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy with cardiac magnetic resonance imaging: linking genotype with fibrotic phenotype. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2014;15:1108–1116.
20. Lopes LR, Rahman MS, Elliott PM. A systematic review and metaanalysis of genotype-phenotype associations in patients with hypertrophic cardiomyopathy caused by sarcomeric protein mutations. *Heart*. 2013;99:1800–1811.
21. Schweizer PA, Schröter J, Greiner S, Haas J, Yampolsky P, Mereles D, Buss SJ, Seyler C, Bruehl C, Draguhn A, et al. The symptom complex of familial sinus node dysfunction and myocardial noncompaction is associated with mutations in the HCN4 channel. *J Am Coll Cardiol* 2014, 64, 757–767.
22. Milano A, Vermeer AMC, Lodder EM, Barc J, Verkerk AO, Postma AV, van der Bilt IAC, Baars MJH, van Haelst PL, Caliskan K, et al. HCN4 mutations in multiple families with bradycardia and left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2014, 64, 745–756.
23. Vermeer AM, Lodder EM, Thomas D, Duijkers FA, Marcelis C, van Gorselen EO, et al. Dilation of the aorta ascendens forms part of the clinical spectrum of HCN4 mutations, *J Am Coll Cardiol* 67 (2016) 2313–2315.

24. Zhou J, Ding WG, Makiyama T, Miyamoto A, Matsumoto Y, Kimura H, Tarutani Y, Zhao J, Wu J, Zang WJ, et al. A novel HCN4 mutation, G1097W, is associated with atrioventricular block. *Circ. J.* 2014, 78, 938–942.
25. Schweizer PA, Duhme N, Thomas D, Becker R, Zehelein J, Draguhn A, Bruehl C, Katus HA, Koenen M. cAMP sensitivity of HCN pacemaker channels determines basal heart rate but is not critical for autonomic rate control. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010, 3, 542–552.
26. Ueda K, Hirano Y, Higashiuesato Y, Aizawa Y, Hayashi T, Inagaki N, Tana T, Ohya Y, Takishita S, Muratani H, et al. Role of HCN4 channel in preventing ventricular arrhythmia. *J Hum Genet* 2009, 54, 115–121.
27. Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesato Y, Hirano Y, Yasunami M, et al. Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem* 2004, 279, 27194–27198.
28. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic cardiomyopathy. Genetics, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and therapy. *Circ Res.* 2017;121:749-770.
29. Li RK, Li G, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Luss H, Rao V, Christakis GT, Williams WG. Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 1997;96:874–881.
30. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Double or compound sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a potential link to sudden death in the absence of conventional risk factors. *Heart Rhythm.* 2012;9:57–63.
31. Girolami F, Ho CY, Semsarian C, Baldi M, Will ML, Baldini K, Torricelli F, Yeates L, Cecchi F, Ackerman MJ, Olivotto I. Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1444–1453.
32. Ortlepp JR, Vosberg HP, Reith S, Ohme F, Mahon NG, Schröder D, Klues HG, Hanrath P, McKenna WJ. Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone system associated with expression of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: a study of five polymorphic genes in a family with a disease causing mutation in the myosin binding protein C gene. *Heart.* 2002;87:270–275.
33. Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR, Ackerman MJ. Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2005;26:2457–2462.
34. Rangaraju A, Rani DS, Satyanarayana M, Calambur N, Swapna N, Nallari P. Genetic variations of α -cardiac actin and cardiac muscle LIM protein in hypertrophic cardiomyopathy in South India. *Exp Clin Cardiol.* 2012;17:26–29.
35. Wang SX, Fu CY, Zou YB, Wang H, Shi Y, Xu XQ, Chen JZ, Song XD, Huan TJ, Hui RT. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene associated with magnitude of left ventricular hypertrophy in male patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Chin Med J (Engl).* 2008;121:27–31.

36. Brugada R, Kelsey W, Lechin M, Zhao G, Yu QT, Zoghbi W, Quinones M, Elstein E, Omran A, Rakowski H, Wigle D, Liew CC, Sole M, Roberts R, Marian AJ. Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Investig Med.* 1997;45:542–551.
37. Lind JM, Chiu C, Ingles J, Yeates L, Humphries SE, Heather AK, Semsarian C. Sex hormone receptor gene variation associated with phenotype in male hypertrophic cardiomyopathy patients. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45:217–222.
38. Patel R, Lim DS, Reddy D, Nagueh SF, Lutucuta S, Sole MJ, Zoghbi WA, Quinones MA, Roberts R, Marian AJ. Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 2369-2377.
39. Chang SM, Lakkis NM, Franklin J, Spencer WH, 3rd, Nagueh SF. Predictors of outcome after alcohol septal ablation therapy in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Circulation.* 2004;109:824-827.
40. Sorajja P, Binder J, Nishimura RA, et al. Predictors of an optimal clinical outcome with alcohol septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2013;81:E58-67.