

# **HYPERTROPHIÁS CARDIOMYOPATHIA FENOKÓPIÁK GENETIKAI VIZSGÁLATA**

A PhD értekezés tézisei

**Csányi Beáta, MSc**

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. med. habil. Sepp Róbert, PhD

II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ

Általános Orvosi Kar

Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2016

## KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

I. **Csányi B**, Popoiu A, Hategan L, Hegedus Z, Nagy V, Racz K, Hógye M, Saghly L, Iványi B, Csanady M, Forster T, Sepp R. Identification of two novel *LAMP2* gene mutations in Danon disease. *Can J Cardiol* 2016; in press (doi: 10.1016/j.cjca.2016.02.071).

**IF: 3,112 (2015)**

II. **Csányi B**, Nagy V, Hategan L, Borbás J, Tringer A, Herczeg B, Forster T, Sepp R. Fabry betegség szűrése többszervi érintettséget mutató hipertrófiás cardiomyopathia eseteiben. *Cardiologia Hungarica* 2016; 46: 158-164.

III. **Csányi B**, Hategan L, Nagy V, Obál I, Varga ET, Borbás J, Tringer A, Eichler S, Forster T, Rolfs A, Sepp R. Identification of a novel *GLA* gene mutation, p.Ile239Met, in Fabry disease with a predominant cardiac phenotype. *Int Heart J* 2016, accepted for publication.

**IF: 1.938 (2015)**

IV. Hategan L, **Csányi B**, Nagy V, Kis O, Kohári M, Ágoston G, Saghly L, Varga A, Iványi B, Forster T, Sepp R. Transthyretin génmutáció azonosítása hypertrophiás cardiomyopathia képében megjelenő amyloidózisban. *Cardiologia Hungarica* 2016, nyomtatásban.

### Az értekezés témájához kapcsolódó idézhető absztraktok:

I. **Csányi B**, Hategan L, Popoiu A, Racz K, Hógye M, Saghly L, Csanady M, Forster T, Sepp R. Danon betegséget okozó *LAMP2* génmutációk azonosítása hypertrophiás cardiomyopathia fenokópiáiban. Identification of *LAMP2* gene mutations in Danon disease manifested as phenocopies of hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiologia Hungarica* 2013; 43:B83.

II. Kanyó É, Popoiu A, Nagy V, Racz K, **Csányi B**, Hategan L, Hógye M, Saghly L, Csanady M, Forster T, Sepp R. Magas mortalitás és gyors progresszió Danon betegségben: három Danon betegségben szenvedő család analízise. Clinical course of Danon disease highlights a highly malignant cardiac disease. *Cardiologia Hungarica* 2015; 45:D100.

III. **Csányi B**, Hategan L, Borbás J, Tringer A, Nagy V, Herczeg B, Forster T, Sepp R. Fabry betegség szűrése cardiomyopathia fenotípusában jelentkező kardiális kórképek esetén. Screening for Fabry disease in cardiac disorders manifesting as cardiomyopathy phenotypes. *Cardiologia Hungarica* 2016; 46:F101.

## **1. BEVEZETÉS**

### **1.1. Hypertrophiás cardiomyopathia**

A hypertrophiás cardiomyopathia (HCM) a myocardium primer betegsége, melyet a bal kamra hypertrophiája jellemez, elsősorban az interventricularis septum érintettségével. Jelen adatok szerint a betegség gyakoribb, mint korábban gondolták, előfordulása kb. 1/500-1000. Ritmuszavarok gyakoriak, s a hirtelen szívhalál kockázata is fokozott. A betegséggel kapcsolatos halálozás, úgy mint hirtelen szívhalál, végstádiumú szívelégtelenség és halálos stroke, előfordulási aránya 1-2 % évente.

### **1.2. A hypertrophiás cardiomyopathia molekuláris genetikája**

Genetikai vizsgálatok igazolták, hogy a HCM az esetek többségében örökletes betegség, típusosan autoszomális domináns öröklődéssel, változó penetranciával és expresszióval. Molekuláris genetikai módszerekkel specifikus, elsősorban sarcomer fehérjéket kódoló gének eltéréseit találták a betegség hátterében, többek között a béta myozin nehéz lánc (*MYH7*), alfa tropomyozin (*TPM1*), troponin T (*TNNT2*), myozinkötő C fehérje (*MYBPC3*), troponin I (*TNNI3*), esszenciális (*MYL3*) és regulatorikus myozin könnyű lánc (*MYL2*), aktin (*ACTC*) és titin (*TTN*) gén érintettségével. Mindezek alapján a HCM-et manapság a szarkomer betegségének tekintjük.

### **1.3. Hypertrophiás cardiomyopathia fenokópiák**

A sarcomer géneket érintő mutációk a HCM-es betegek 40-60%-nál fordul elő. Az esetek 5-10%-ban a mutációk más, nem-sarcomer géneket érintenek, ekkor HCM fenokópiákról beszélhetünk (Fabry betegség, Danon betegség, transthyretin amyloidosis, stb.). Az esetek további 20-25 %-ban a HCM kialakulásáért felelős okok még egyelőre ismeretlenek. Néhány öröklődő betegség esetében, mint például metabolikus és mitokondriális kórképek, szintén megfigyelhetők klinikai fenokópiák, melyeket jól meglehet különböztetni és el lehet különíteni a szívvel kapcsolatos és nem-kardiális tulajdonságok, illetve az egyedi molekuláris genetikájuk alapján. A HCM fenokópiák öröklődés módja, természete és kezelése eltér a sarcomer géneket érintő mutációk által kialakuló HCM-es betegektől. A részletes klinikai értékelés és molekuláris genetikai vizsgálatok nagyon fontosak a pontos diagnózis felállításánál, illetve a genetikai tanácsadás, prognosztikai értékelés és a megfelelő klinikai kezelés szempontjából.

#### **1.3.1. Danon betegség**

A Danon betegség (OMIM# 300257) egy ritka, X-kromoszómához kötötten öröklődő betegség, melyet a cardiomyopathia, vázizom myopathia és mentális retardáció triászával lehet jellemezni. A vázizom myopathia általában enyhe lefolyású, míg a mentális retardáció

változatos lehet. A klinikai megjelenést általában a hypertrophiás cardiomyopathia dominálja. A nők enyhébb formában érintettek, mint a férfiak, a betegség lefolyása késő felnőttkorban jelentkezik és lassabb progressziót mutat.

A Danon betegséget a lizoszóma-kapcsolt membránprotein-2 (lysosome-associated membrane protein-2, LAMP-2) rendellenessége okozza. A betegség X-kromoszómához kapcsolt domináns öröklésmenetet mutat az esetek nagy részében, mivel leginkább a férfiakat érinti, illetve az érintett nők esetében enyhébb és késő megjelenésű kardiális tünetek figyelhetők meg. Ezen felül nem volt megfigyelhető férfiról férfire történő transzmisszió. A *LAMP2* gén a Xq24 kromoszóma régióban található. A gén nyitott leolvasási kerete 1,233 nukleotidból áll, mely 410 aminosavat kódol.

A Danon betegség molekuláris diagnózisa a LAMP-2 protein hiányának kimutatásából áll váz-, illetve szívizomban, vagy a *LAMP2* gén mutációinak azonosításából.

### **1.3.2. Fabry betegség**

A Fabry betegség (FD, OMIM# 301500) X-kromoszómához kötött recesszíven öröklődő ritka kórkép, melyet az  $\alpha$ -galaktozidáz A enzim ( $\alpha$ -gal A; GLA; EC 3.2.1.22) hibás működése okoz. Az enzim feladata az, hogy hidrolizálja a glikolipidekből és glikoproteinekből származó terminális alfa-galaktozil molekularészeket, nem megfelelő működése következtében intralizoszómális glikoszíngolipid lerakódás történik, mely vagy szisztémás vagy szervspecifikus Fabry betegséghez vezet. A hemizigóta érintetteknél a betegség elsősorban acroparthesia, angiokeratoma, hypohidrosis, cornealis és lenticularis elváltozások formájában manifesztálódik, illetve progresszív vaszkuláris eltérések kialakulása figyelhető meg a vesében, szívben és az agyban. Első tünetek gyermekkorban vagy a serdülőkor korai szakaszában jelentkeznek. Kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris érintettségre utaló tünetek általában a negyedik dekádban alakulnak ki. A szív érintettsége bal kamra hypertrophia, hypertrophiás cardiomyopathia, vezetési zavarok formájában a Fabry betegek 60%-ban mutatható ki. Veseelégtelenség, szívelégtelenség és/vagy szívinfarktus, stroke a leggyakoribb halálokok az érben lerakódott és felhalmozódott lipid lebontási termékek, a globotriaosylceramid (GL-3) miatt.

A humán  $\alpha$ -galaktozidáz A enzimet a *GLA* (OMIM#300644) gén kódolja, mely a 22-es (Xq21.3-q22) kromoszómán található. A gén legfőbb transzkriptuma 1318 bázispárból áll, 7 exont és 6 intront tartalmaz, mely egy 429 aminosavból álló homodimer glikoproteint kódol. Jelenleg az irodalomban 664 *GLA* gént érintő mutáció ismert, melyek összefüggésbe hozhatók Fabry betegség kialakulásával.

### 1.3.3. Transthyretin amyloidosis

Az amyloidosis olyan betegségek összefoglaló elnevezése, melyet egymáshoz nagyon hasonló, morfológiailag megkülönböztethetetlen, gyűjtőnevükön amyloidnak nevezett extracelluláris lerakódások okoznak. A prekursor fehérje a szérumban abnormális formában és mennyiségben lehet jelen. Nem tisztázott, mi teszi ezeket a fehérjéket amyloidogénné. Az amyloid depozíció sokféle szövetet, szervet érinthet, leggyakrabban a vesét, májat, szívet, a vegetatív idegrendszert, akár együttesen több szervet vagy izoláltan egy-egy szervet.

A szív érintettsége az amyloidosis három formájában a leggyakoribb. Az AL amyloidosisban immunglobulin könnyűlánc lerakódás jön létre, míg az SSA (senile systemic amyloidosis) amyloidosisban vad típusú transthyretin fehérje, az ATTR amyloidosisban mutáns transthyretin fehérje akkumulációja történik. Ezeken kívül még külön csoportba soroljuk a szérum-amyloid-A eredetű amyloidosist (AA) és az izolált pitvari amyloidosist (AANF). A vad típusú transthyretin lerakódása által okozott szenilis amyloidosis esetén tipikusan 70-80 éves korban, míg az örökletes típusú amyloidosis esetében 60 éves korban jelentkezik a betegség. A transthyretin amyloidosis típusosan két szervrendszert érint, mely alapján két domináló fenotípusban jelentkezik a betegség: örökletes amyloid polineuropathiában a fenotípust a neuropathia dominálja, míg familiáris szív amyloidosisban a cardiomyopathia a lényegi morfológiai eltérés. Mindazonáltal a két fő fenotípus között lényegi átfedés lehetséges, és fentiekén túl okulo-meningeális formák is ismertek.

A családi öröklődést mutató TTR-kapcsolt amyloidosis (ATTR) autoszomális domináns öröklésű betegség, inkomplett penetranciával, amelyet a transthyretin (prealbumin) termelődéséért felelős génben található valamilyen mutáció okoz. A humán transthyretin (TTR; MIM# 176300) vagy prealbumin génje a 18-as (18q12.1) kromoszómán található. Legfőbb transzkriptuma 957 bázispárból áll, 4 exont és 3 intront tartalmaz, mely egy homotetramer transthyretin fehérjét kódol.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatainkat megelőzően nem volt ismert a HCM fenokópiák előfordulási gyakorisága a magyar hypertropiás cardiomyopathiás betegpopulációban. A HCM fenokópiák jelentősen eltérnek a sarcomer géneket érintő mutációk által kialakuló HCM-től, ezért a megfelelő genetikai tanácsadáshoz, a prognosztikai értékeléshez és klinikai kezeléshez nélkülözhetetlen a pontos diagnózis, a részletes klinikai értékelés és a mutációk alapos vizsgálata. Célunk ezért az volt, hogy olyan HCM-es betegeket vizsgáljunk, kiknél HCM fenokópiára utaló többszervi érintettség is megfigyelhető volt. Fentiek alapján PhD munkámban a következő célkitűzéseim

voltak: 1. Mutációk azonosítása a lizoszóma-kapcsolt membránprotein-2 (*LAMP2*) génben Danon betegség gyanúja esetén; 2. Mutációk azonosítása az  $\alpha$ -galaktozidáz A (*GLA*) génben Fabry betegség gyanúja esetén; 3. Mutációk azonosítása a transthyretin (*TTR*) génben felmerülő transthyretin amyloidosis gyanúja esetén; 4. A *LAMP2*, *GLA* és *TTR* gének mutációit hordozó betegek családtagjainak klinikai és genetikai szűrése.

### **3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Betegek**

Olyan betegeket vizsgáltunk, kiknél felmerült HCM fenokópia gyanúja. A betegeknél minden esetben anamnézis és státusz felvétel, fizikai vizsgálat, a rendelkezésre álló klinikai dokumentáció áttekintése, 12 elvezetéses testfelszíni EKG készítése és transthoracalis echocardiographia történt. Indokolt esetben intézeti felvétel keretében részletes kardiológiai kivizsgálást végeztünk (24 órás Holter monitorizálás, terheléses vizsgálat, fekvőkerékpár stressz echocardiographia, szív MRI, coronarographia, hemodinamikai vizsgálat). A HCM diagnózisa minden esetben nemzetközileg elfogadott diagnosztikus kritériumokon alapult.

##### **3.1.1. A *LAMP2* génmutációk azonosítása Danon betegség gyanúja esetén**

Két nem rokon beteget és családjukat vizsgáltuk, akinél HCM morfológia volt megfigyelhető és felmerült Danon betegség gyanúja (izomsorvadás jelei, mentális retardáció) is.

##### **3.1.2. A *GLA* génmutációk azonosítása Fabry betegség gyanúja esetén**

Összesen 21 (14 nő, átlag életkor:  $52 \pm 13$  év; 7 férfi; átlag életkor  $47 \pm 17$  év) beteget szűrtünk, kikben a Fabry betegség gyanúja felmerült lehetséges szív érintettséget jelző kardiális fenotípus és együttesen fennálló, más szervi érintettségre (neurológia, vese, bőr) utaló tünetek alapján. A betegek közül 18 esetben a szív érintettség hypertrophiás cardiomyopathia (4 férfi, 9 nő, átlagéletkor  $46 \pm 14$  év) vagy bal kamra hypertrophia (4 férfi, 1 nő, átlagéletkor  $60 \pm 7$  év) formájában nyilvánult meg; míg 1-1 esetben restriktív ill. dilatatív cardiomyopathia képében. Egy esetben, ahol Fabry kórra jellemző cornea verticillata jelentette a szűrés indikációját, nem volt jelen lényegi kardiális érintettség. A cardiomyopathiák diagnosztizálása érvényben lévő diagnosztikai ajánlások alapján történt. A nem kardiális manifesztációt 9 esetben neurológiai eltérések (cerebrovascularis inzultus, tranzienis ischaemias attack, CT-vel igazolt fehérállományi károsodás, acroparaesthesia), 6 esetben nephrológiai eltérések (proteinuria, nephropathia, veseelégtelenség), 2 esetben szemészeti eltérések (cornea verticillata, retina dystrophia), 2 esetben bőrtünetek, 3 esetben egyéb (nem HCM-re jellegzetes) kardiológiai eltérések (III. fokú AV blokk, kifejezett restriktív fiziológia amyloidosis kizárása mellett) jelentették. A családszűrés két esetben volt lehetséges.

### 3.1.3. A *TTR* génmutációk azonosítása transthyretin amyloidosis gyanúja esetén

Két nem rokon betegben végeztük el a *TTR* gén genetikai analízisét, ahol hypertrophiás cardiomyopathia képében megjelenő kardiális fenotípus háttérében transthyretin amyloidosis merült fel. Az első beteg, egy 60 éves férfi volt, akinél intermittáló másod- és harmadfokú AV blokkot észleltünk, míg a másik beteg, 70 évesen, szívelégtelenség miatt került kórházba. A képalkotó eljárások hypertrophiás cardiomyopathiát igazoltak mindkét esetben, kifejezett diasztolés diszfunkcióval és restriktív kamrai telődéssel. A szívizomszövet kórszövetteni vizsgálata igazolta a transthyretin amyloidosist. Mindkét páciens kórtörténetében szerepelt carpal tunnel szindróma.

## 3.2. Módszerek

### 3.2.1. A *LAMP2*, *GLA* és *TTR* gének molekuláris genetikai analízise

A vizsgált betegek, illetve családtagjaik a törvényi szabályozásnak megfelelően, részletes tájékoztatás után írásos beleegyezésüket adták a genetikai analízishez. A genomi DNS-t perifériás vérből izoláltuk standard technikával (GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific). A *LAMP2* (9 exon), *GLA* (7 exon) és *TTR* (4 exon) gének teljes kódoló szakaszait tartalmazó exonokat és az exon-intron határokat az irodalomban közölt primerek felhasználásával, PCR technikával felamplifikáltuk, majd a kapott mintákat direkt módon megszekvenáltuk ABI Prism 310 Genetic Analyzer-rel (Applied Biosystems). A kapott elektroferogramot a normál referencia szekvenciával hasonlítottuk össze. Az elektroferogramok elemzését Sequencing Analyzer v5.4 szoftverrel végeztük.

### 3.2.2. A *LAMP2* génmutációk restriktív fragment analízise

Mind a két azonosított *LAMP2* mutáció érint restriktív hasító helyet, ezért lehetőség volt a mutációk restriktív fragment analízisére is. Az 'A' család esetén a mutáció megszüntette a restriktív hasító helyet, így az AlwNI enzim nem volt képes felismerni és hasítani az adott helyet. A 'B' család esetében a mutáció egy extra hasító helyet eredményezett a BslI enzim számára. A restriktív analízist a gyártók általi ajánlások alapján végeztük el.

### 3.2.3. Bioinformatika

A nukleotid változásokat a Európai Molekuláris Biológia Laboratórium-Európai Bioinformatikai Intézet [European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute (Ensembl database, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org))] adatbázisában található referencia szekvenciák alapján értékeltük [LAMP2-001 (ENST00000200639), GLA-001 (ENST00000218516) és TTR-001 (ENST00000237014.7)]. A *TTR* variánsok annotálása az új



nomenklátúra szerint történt (a szignál peptid figyelembe vételével 20 aminosavval növekedett a hossz).

### 3.2.4. Linkage analízis

A *GLA* gén p.Ile239Met mutációját hordozó családban a család mérete illetve az érintett családtagok száma miatt lehetőség volt linkage analízis elvégzésére. A vizsgálat a FASTLINK programmal történt. A kapcsoltságot az érintettségi státusz és a mutáció között a következő paraméterekkel modelleztük: a betegség allél frekvenciája: 1:10.000, a betegség penetranciája: 90%.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. *LAMP2* génmutációk azonosítása Danon betegség esetén

#### 4.1.1. Mutáció adatok

Két új *LAMP2* génmutációt azonosítottunk a két index betegben. Az első proband családjában ('A' család) egy G-A tranzíciót azonosítottunk a gén 8. exonjában, mely hatására a triptofánt kódoló TTG triplet, egy Stop kodont kódoló TAG tripletté változott a 321. pozícióban (p.Trp321Stop, nonszensz mutáció. A 'B' család esetén egy bázispáros inszerció történt, szintén a 8. exonban (c.973insC), mely frame-shift mutációt eredményezett. Predikciós analízis azt mutatta, hogy 24 extra aminosav épül be a fehérjébe az utolsó normál prolin aminosav után a 324. pozícióban, majd az átírást egy korai Stop kodon állítja meg (p.Pro324fs+24X). A nukleotid cserék a megfelelő pozíciókban minden esetben találhatóak voltak a reverz szálon is. A két mutáció nem volt detektálható 200, ugyanabból a földrajzi térségből származó normál kontroll esetében.

Mindkét mutáció restriktions hasító helyeket érintett; ezért a két mutációt restriktions analízissel is lehetett igazolni. Az 'A' család esetén a mutáció megszüntette az AlwNI enzim hasítóhelyét site (5'-CAGNNNCTG-3'), míg a 'B' család esetében a mutáció egy extra hasító helyet hozott létre a BslI enzim számára (5'-CCNNNNNNNGG-3').

Mindkét mutáció következtében csonkolt LAMP-2 fehérje jön létre, mely a transzmembrán domén teljes elvesztését, illetve a citoplazmikus farok rövidülését eredményezi. A fehérje ezen részei jól konzerváltak a különböző fajokban, illetve a különböző human *LAMP2* gén splice variánsoknál, ezért a mutációk káros hatásának számítanak.

Az 'A' család esetén a nagymamától, az anyától, a két nővértől és az unokatestvértől sikerült DNS-t vizsgálni. Az összes vizsgált családtag mutáció hordozónak bizonyult.

A 'B' család esetén az anyát és a testvért tudtuk szűrni a mutációra. Az anya mutációhordozónak, még a fivér negatívnak bizonyult.

Összesen 11 családtagot vizsgáltunk a két családban, míg a genetikai analízis 9 családtag esetében történt meg. Nyolc családtag bizonyult a *LAMP2* génmutáció hordozójának. A nyolc mutációhordozó közül, négy családtag nem volt klinikailag érintett (a cardiomyopathia megjelenését figyelembe véve). A 4 tünetmentes tag mellett DNS diagnózissal két családtagnál igazoltuk a mutációt, kiknél a betegségre utaló tünetek is jelentkeztek. Ez azt jelenti, hogy összesen a két családban 6 mutációhordozót találtunk, akik bizonyítottan betegek.

#### **4.2. *GLA* génmutációk azonosítása Fabry betegség esetén**

A 21 beteg közül négy esetben (4/21, 19%) tudtunk *GLA* génmutációt igazolni [p.Ile239Met (c.717A>G); p.Tyr397Stop (c.1191T>G), c.548-57\_-56dupTA; p.Glu358Lys (c.1072G>A)]. Mind a négy észlelt beteg nőbeteg volt, átlagéletkoruk  $49 \pm 15$  év volt. A bal kamra hypertrophia vagy hypertrophiás cardiomyopathia fenotípusával jellemzett 18 betegben fordult elő a 4 azonosított mutáció közül 3 mutáció, mely szerint ebben az alcsoportban a *GLA* génmutáció előfordulási aránya 17% volt (3/18). A negyedik mutációt (p.Glu358Lys), egy lényegi kardiális fenotípus nélküli nőbetegben észleltük, kiben cornea verticillata indikálta a szűrést.

A p.Ile239Met *GLA* génmutációt egy három-generációs családhoz tartozó betegben azonosítottuk. Három családtagnál, beleértve az index beteget is, hypertrophiás cardiomyopathiát észleltünk, míg másik két családtagnál BK hypertrophia volt megfigyelhető. Azok a családtagok, kiknél megfigyelhető volt hypertrophiás cardiomyopathia, BK hypertrophia vagy emelkedett lyso-Gb3 szint, az összes klinikailag érintett családtag hordozta a mutációt, míg a klinikailag nem érintett családtagok nem. A kapcsoltsági vizsgálat során a család LOD score-ja 2.01 lett az érintettségi státusz és a p.Ile239Met *GLA* génmutáció tekintetében, mely erősen valószínűsíti a kapcsoltság tényét. A lyso-Gb3 szint minden esetben emelkedett volt a mutációhordozó tagokban (tartomány: 2.4-13.8 ng/ml; normál felső határa +2 STD:  $\leq 1.8$  ng/ml). A *GLA* enzim szint jelentősen csökkent volt az érintett férfi családtagokban ( $< 0.2$   $\mu\text{mol/l/h}$ ; normál felső határa  $\pm 2$  STD):  $\geq 2.6$   $\mu\text{mol/l/h}$ ).

#### **4.3. *TTR* génmutációk azonosítása transthyretin amyloidosis esetén**

A két betegben két non-szinoním *TTR* gén variánst azonosítottunk. Az 'A' beteg esetében egy A-G tranzíciót detektáltunk a gén 3. exonjában (c.323A>G), mely következtében a hisztidint kódoló CAT tripletból arginint kódoló CGT triplet lesz a 108. kodon pozícióban (p.His108Arg, missense mutáció). A proband elsőági családtagjai közül a beteg 85 éves korában, szívelégtelenségben elhunyt édesanyja vérmintájának genetikai vizsgálatára volt lehetőség, mely mutáció hordozó státuszt igazolt.

A 'B' beteg esetében egy G-A tranzíciót észleltünk a gén 2. exonjában (c.76 G>A), mely a glicint kódoló GGT tripletet szerint kódoló AGT tripletre változtatta (p.Gly26Ser). Utóbbi mellett egy szinoním, az aminosav sorrendet nem megváltoztató polimorfizmust is detektáltunk (c.57G>A, Glu19Glu).

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5.1. A *LAMP2* gén mutációk azonosítása Danon betegekben

Két HCM-es beteget szűrtünk, kiknél kifejezett koncentrikus hypertrophia és pre-excitáció jelei voltak megfigyelhetők az EKG-n. Mindkét esetben egy-egy novel *LAMP2* génmutációt azonosítottunk, mely a Danon betegséget okozta. Mindkét mutáció következtében csökkent LAMP-2 fehérje jön létre, mely a transzmembrán domén teljes elvesztését, illetve a citoplazmikus farok rövidülését eredményezi. Megfigyeltük, hogy a mutációk erősen malignus hatásúak mindkét család esetében. A legjobb tudomásunk szerint az általunk vizsgált 'A' család az egyik legnagyobb az eddig közölt esetek közül, kiknél a legnagyobb számban lett elvégezve a DNS diagnózis is. Az általunk vizsgált két családban összesen 8 mutáció hordozót (6 az 'A' családban és 2 a 'B' családban) azonosítottunk, mely alapján egyértelmű következtetéseket lehetett levonni a betegség klinikai megnyilvánulásáról.

Mindkét esetben az index betegeknél a Danon betegség tipikus klinikai manifesztációi voltak megfigyelhetők, úgy mint extrém koncentrikus balkamra hypertrophia, pre-excitáció jelei az EKG-n, vázizom sorvadás vagy CK emelkedés és változatos mentális retardáció. A kardiális fenotípus az érintett családtagokban, beleértve a nőket is, hypertrophiás cardiomyopathia volt, az arrhythmiai és bradyarrhythmiai magas prevalenciája mellett. Négy, a betegséggel összefüggő haláleset történt a két családban, ahol az átlag életkor  $35 \pm 18$  év volt, mely egyértelműen alacsonyabb volt a férfiaknál, mint a nőknél ( $27 \pm 10$  vs.  $42 \pm 25$  év).

Az egyik azonosított mutáció, p.Trp321Stop, egy nonszensz mutáció, mely feltehetően egy korai Stop kodon kialakulásához vezet a 321. pozícióban. A másik észlelt mutáció, p.Pro324fs+24X, egy egy bázispáros mikorinszerció, mely a leolvasási keret eltolódásához vezet és 24 extra aminosav beépülését eredményezi, mielőtt egy rejtett Stop kodon megállítaná az átíródást. Egyik mutáció sem volt korábban közölve. Megjegyzendő, hogy az utóbbi mutáció már említésre került a COSMIC adatbázisban korábban melanoma sejtek kapcsán, talán a magasabb mutációs rátának köszönhető ebben a régióban.

### 5.2. A *GLA* gén mutációk azonosítása Fabry betegekben

Jelen munkában szív-, de egyidejűleg feltételezett egyéb szervi manifesztációval járó Fabry betegség gyanúja esetén végeztünk szűrővizsgálatot Fabry betegség irányában. A 21 vizsgált

beteg közül 4 esetben detektáltunk *GLA* gén mutációt, mely alapján a Fabry betegség előfordulási aránya vizsgálat betegcsoportunkban 19%-nak adódott (4 nő, átlag életkor  $49 \pm 15$  év). Amennyiben csak a bal kamra hypertrophiával/hypertrophiás cardiomyopathiával járó alcsoportot vesszük figyelembe, a *GLA* mutációk 17%-ban fordultak elő. Utóbbi, korábbi vizsgálatoknál magasabb előfordulási arányt az magyarázza, hogy jelen vizsgálatba olyan módon választottuk be a betegeket, hogy ne csak izolált szív, hanem utóbbi mellett egyéb feltételezett szervi manifesztációra (neurológiai, nephrológiai, bőr, stb.) utaló jelek is jelen legyenek. Fenti adatok összességében jól jelzik, hogy „típusos” HCM esetén a Fabry betegség előfordulási aránya alacsony (kb. 0.5-1%), de ha a HCM mellett egyéb lehetséges szervi manifesztáció is jelen van, a Fabry betegség fennállásának esélye jelentősen megnő.

A négy általunk észlelt *GLA* mutáció közül egy már ismert, míg három korábban nem közölt, novel génmutáció. Bár az általunk azonosított p.Ile239Met mutációt korábban még nem közölték, ismert egy, ugyanazon kodont érintő *GLA* mutáció (p.Ile239Thr), mely Fabry betegség kialakulásához vezet. Az azonosított p.Tyr397Stop az irodalomban eddig még nem közölt, novel mutáció. A mutáció feltehetőleg a leolvasási keret megszakadását okozza, melynek következtében egy rövidebb, csonkolt fehérje jön létre, melynek funkciója nem megfelelő. A betegség biomarkere, a lyso-Gb3 szintje enyhén emelkedett a mutációhordozókban. A c.548-57\_-56dupTA variáns szintén korábban még nem közölt heterozigóta variáns a *GLA* gén 3. intronjában. Predikciós analízis alapján a variáns hatása neutrálisnak volt tartható, a mRNS 'splicing'-jára feltételezett közömbös hatás miatt. Utóbbi alapján a variáns inkább 'bizonytalan hatású variáns'-nak ('variant of unknown significance', VUS)-nak tartható, bár a beteg kórszövettani vizsgálata Fabry betegségre jellemző eltéréseket igazolt. A p.Ile239Met *GLA* génmutációt egy három-generációs családban azonosítottuk. Az 'American College of Medical Genetics and Genomics' (ACMG) és az 'Association for Molecular Pathology' (AMP) ajánlásai alapján a bizonyítékok tükrében a mutáció betegséget okozó, 'patogén' hatásúnak bizonyult. Az első és legfontosabb megfigyelés, hogy az érintett férfi családtagban jelentősen lecsökken a *GLA* enzim szintje, illetve növekedett a lyso-Gb3 szint minden mutációhordozóban, ez a bizonyíték arra, hogy a mutáció káros hatással van a géntermékre. Másrészt a mutáció hiányzik a kontrollokból (Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project vagy Exome Aggregation Consortium). Harmadrészt a mutáció egy novel misszensz mutáció, viszont ugyanebben a pozícióban korábban már azonosítottak egy másik variánst, ami szintén patogénnek bizonyult (p.Ile239Thr, lsd. feljebb). Negyedrészt bebizonyosodott, hogy a *GLA* gént érintő mutációt hordozó családtagok mind klinikailag is

érintettek, tehát a mutáció felelős a betegség kialakulásáért. Ötödrészt predikációs modellek szintén alátámasztják a gén vagy géntermék káros hatását.

### **5.3. A *TTR* gén mutációk azonosítása transthyretin amyloidosisos betegekben**

A *TTR* génnek több mint 100 mutációja ismert jelenleg a 'Human Gene Mutation Database' adatbázisa alapján. A *TTR* gén egyes eltérései különböző fenotípussal járnak: neuropathiás, cardiomyopathiás, nephropathiás, szemet érintő formák ismertek. Adott populációkban jellegzetes formák halmozódnak. Azonos genetikai háttér mellett is lehet változatos a klinikai megjelenés, maradhat szinte tünetmentes a folyamat, vagy lehet súlyos, kezdődhet fiatal korban vagy későn. A gént érintő mutációk közül a pontmutációk (missense) a legjellemzőbbek, de leírtak már kis deléciókat és kis indel mutációkat is. Ritka esetekben létrejöhet a gén „új” (de novo) mutációja is, mely nem jelenik meg más családtagban. A *TTR* génben előforduló mutációk a kódolt fehérje konformációs változásához vezetnek, amely alapvető fontosságú amyloid rostok képződésében.

Az általunk az 'A' betegben észlelt p.His108Arg *TTR* génmutációt korábban egy svéd családban is leírták már. A 65 éves index betegben bi-ventrikuláris szívelégtelenséget észleltek, globálisan megvastagodott kamra falakkal (IVS: 21 mm), bal kamrai hypokinezissel, emelkedett NT-pro-BNP értékekkel. A kardiális érintettség mellett gasztrointesztinális és polyneuropathiás tünetek álltak fenn. A beteg 5 éves után követés után 70 éves korában halt meg. A család szűrővizsgálata további hat érintett családtagot igazolt, kik közül öt családtagban manifesztálódott a betegség, dominálón késői életkorban (>50 év) jelentkező cardiomyopathia formájában. Genealógiai vizsgálatokkal egy 9-10 generációval korábban, a XVII. században élt közös ősré tudták visszavezetni az 'alapító' mutáció kialakulását.

A 'B' betegben azonosított variáns, p.Gly26Ser variáns irodalmi adatok szerint egy nem ritka variánsnak számít világszerte. A p.Gly26Ser allél frekvenciája 6-12% az átlag kaukázusi populációban, 4% észak-amerikai ashkenázi zsidó, 7% észak-amerikai nem-zsidó, 6% portugál és 1 % afro-amerikai populációban. Mindezek alapján a variánst benignus, nem amyloidogén *TTR* variánsnak tartják. Tekintettel a betegben immunhisztokémia vizsgálattal igazolt *TTR* lerakódásra, és a *TTR* génmutáció hiányára, a *TTR* infiltráció vad-típusú transthyretinnek, és az eset szenilis amyloidosisnak felel meg.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MEGÁLLAPÍTÁSOK

### 1. Munkánkban két új *LAMP2* gén mutációt azonosítottunk Danon betegség esetén.

Extrém mértékű koncentrikus balkamra hypertrophia, EKG-n észlelt pre-excitáció, izomsorvadás/CK emelkedés és változatos mértékű mentális retardációval jellemzett két Danon betegben és családtagjaikban a *LAMP2* gén két novel, p.Trp321Stop és p.Pro324fs+24X, mutációját azonosítottuk. Mindkét mutáció hatására feltehetően csonkolt LAMP-2 fehérje jön létre, mely feltételezhetően a transzmembrán és citoplazmikus domének hiányát eredményezi. Markánsan malignus fenotípust találtunk mindkét családban, a betegséghez köthető halálozás kifejezetten magas arányával.

### 2. Munkánkban új és ismert *GLA* gén mutációkat azonosítottunk Fabry kóros betegekben.

Kardiális és extrakardiális érintettség alapján felmerülő Fabry betegség gyanúja esetén ismert (p.Glu358Lys) és több novel (p.Ile239Met, p.Tyr397Stop, c.548-57\_-56dupTA) *GLA* gén mutációt azonosítottunk. Részletesebben leírtunk egy családot, kikben a novel p.Ile239Met *GLA* gén mutációt detektáltuk. A családban a kardiális manifesztáció elsősorban HCM, balkamra hypertrophia és EKG változások képében jelentkezett, illetve egy családtagnál súlyos veseelégtelenség is megfigyelhető volt. Bizonyítottuk, hogy a p.Ile239Met *GLA* mutáció egy patogén *GLA* mutáció, mely Fabry betegség kialakulásához vezet és nyilvánvalóan kapcsolható a késői kialakulású és túlnyomórészt szívet érintő változatához a betegségnek.

### 3. A Fabry betegség prevalenciáját 17 %-nak találtuk olyan betegek körében, kiknél többszervi érintettségre utalóan, a hypertrophiás cardiomyopathia és bal kamra hypertrophia mellett más szervi manifesztációk is megfigyelhetők voltak.

A *GLA* gén mutációk által okozott Fabry betegség prevalenciáját 17%-nak találtuk olyan betegekben, kiknél felmerült a Fabry betegség gyanúja, figyelembe véve a kardiális (főleg hypertrophiás cardiomyopathia vagy balkamra hypertrophia) és extrakardiális (neurológiai, renális, szemészeti és bőrt érintő tünetek) manifesztációkat. Eredményeink arra utalnak, hogy ha ismeretlen eredetű balkamra hypertrophia vagy HCM mellett más szervi érintettség is észlelhető, akkor a Fabry betegség előfordulásának lehetősége magasabb.

### 4. Munkánkban *TTR* gén mutációkat azonosítottunk transthyretin amyloidosisos betegekben.

Két, nem-szinoním transthyretin gén variánst azonosítottunk két betegben, kiknél domináló hypertrophiás cardiomyopathia megjelenése volt megfigyelhető. Az első esetben egy korábban már közölt malignus misszensz mutációt (p.His108Arg) azonosítottunk az index

betegben és édesanyjában, ezért az eset örökletes transthyretin amyloidosisnak felel meg. A második esetben vad típusú transthyretin lerakódása volt kimutatható, így ennél a betegnél szenilis szisztémás amyloidosis esete állt fenn.

## **7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretnék köszönetet mondani a PhD dolgozatomhoz szükséges munkában minden közreműködő és segítséget nyújtó személynek.

Köszönöm témavezetőm, Sepp Róbert tanár úr folyamatos, lelkes támogatását és értékes javaslatait, melyek alapvető mértékben hozzájárultak a dolgozat illetve a tudományos közlemények megszületéséhez.

Hálás köszönet illeti Forster Tamás és Csanády Miklós professzor urakat, a II. sz. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ jelenlegi és korábbi igazgatóját, támogatásukért és tanácsaikért, és azért a lehetőségért, hogy intézetükben biztosították a kutatásaimhoz szükséges feltételeket.

Köszönöm a Molekuláris Genetikai Laboratórium munkatársainak, diáktársaimnak a segítő közreműködését, a hosszas konzultációkat, ötleteiket, javaslataikat.

Külön köszönöm Molnár Jánosné Klári, a Molekuláris Genetikai Laboratórium vezető asszisztensének segítségét, kinek mindennapi szakértői segítsége nélkül a dolgozat és közlemények alapjául szolgáló eredmények nem születhettek volna meg.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családom, szüleim és barátaim odaadó szeretetét és folyamatos támogatását.