

Gén alapú diagnosztika és terápia a kardiológiában

Szelid Zsolt

Semmelweis Egyetem, Kardiológiai Központ

2008. május 27

Gén alapú stratégiák a kardiológiában

Diagnosztika

Monogénesen öröklődő
CV betegségek

Genetikai rizikófaktorok
(pl. SNP)

Terápia

Gén alapú terápia

Sejtterápia

Farmakogenomika
(egyénnre szabott terápia)

Gén alapú diagnosztika I.

Monogénesen öröklődő CV betegségek

Cardiomyopáthiák

HCM (50%-ban familiáris, AD)

DCM (25-30%-ban genetikai ok, AD)

RCM

Aritmiák (channelopáthiák)

LQTS

SQTS

Brugada sy

CRVD

<i>Fenotípus</i>	<i>Gén/Fehérje</i>	<i>Locus</i>
Változó MH és HH	MYH7/ Béta myosin nehéz lánc	14q11-12
Minimális MH,gyakori HH gyors progresszió DCM-be	TNNT2/ Troponin T	1q32
Progresszív MH (öregkori) Szívelégtelenség	MYBPC3/ Kardiális myosin kötő protein C	11p11.2
Általában jó prognózis, MH	TPM1/ alfa-tropomyosin	15q22
Apicális MH, öregkori MH	TNNI3/ Troponin I	19q13.4
Közép-szegmentum MH	MYL2/ Kamrai myosin reg. könnyü lánc	12q23-24
Közép szegmentum MH	MYL3/ Myosin könnyü lánc	3p21
Ritka	ACTC/ Actin	15q14
Ritka	TTN/ Titin	2q31
Ritka, öregkori MH	MYH6/ Alfa myosin nehéz lánc	14q11-12
MH és Wolff-Parkinson White szindróma Glikogén tárolási betegség	PRKAG2/ Kardiális 5-AMP aktivált protein kináz	7q35

Gén alapú diagnosztika I. FHCM

Familiáris hipertrófiás cardiomyopathia (FHCM)

80%-ban a béta myosin nehézlánc (MYH7 gén) és a kardiális myosin kötő protein C (MYBPC3) mutáció

Jellemzően progresszív hypertófia (pl. MYH7 esetén), versus hirtelen halál csak minimális hipertrófiával (pl. Troponin T /TNNT2/ mutáció esetén)

Gén alapú diagnosztika I. DCM

Mk, vagy egyik kamra dilatációval és dominálónan szisztolés diszfukcióval járó betegség

Idiopáthiás etiológia a betegek 50%-ában

25-30%-ban genetikai ok – ezen belül is diverz megoszlás

Leggyakoribb: lamin A/C (vezetési zavar is) és béta myosin nehéz lánc mutáció (5-10%-ért felelősek)

Gén	Fehérje	Funkció
Autoszomális Domináns (90%-ban)		
ACTC	kardiális aktin	szarkomer fehérje, izomkontrakció
DES	dezmin	disztrofin-asszociált glikoprotein komplex, izomerő átvitel
SGCD	sarkoglikán	disztrofin-asszociált glikoprotein komplex, izomerő átvitel
MYH7	myosin nehéz lánc	szarkomer fehérje, izomkontrakció
TNNT2	troponin T	szarkomer feh., izomkontrakció
TPM1	tropomyozin	szarkomer feh., izomkontrakció
TTN	titin	szarkomer strukturális feh.
VCL	metavinculin	szarkomer strukturális feh.
MYBPC	myosin-kötő protein C	szarkomer feh., izomkontrakció
MLP/ CSRP3	izom LIM fehérje	szarkomer feh. /Z vonal
ACTN2	actinin-2	szarkomer strukturális feh., myofibrilláris aktint "lehorgonyzó" fehérje
PLN	phospholamban	szarkoplazmatikus reticulum Ca ⁺⁺ regulátor, SERCA2 pumpát gátolja
ZASP /LBD3	cypher/LIM kötő domén 3	cytoskeleton fehérje, membrán fehérjék regulálása
MYH7 ABCC	myozin nehéz lánc SUR2A	szarkomer fehérje; izomkontrakció Kir6.2 szabályozó alegysége, ATP dependens K csatorna működés szabályozása
LMNA	lamin A/C	magmembrán fehérje, magmembrán stab.
X-hez kötött		
DMD	dystrophin	a dystrophin-asszociált glycoprotein alegysége, izomerő átvitel
TAZ/G4.5	tafazzin	nem ismeret (korai életkorban letális)
Autoszomális Recesszív		
TNN13	troponin I	szarkomer fehérje, izomkontrakció

Gén alapú diagnosztika I.

Monogénesen öröklődő CV betegségek

Cardiomyopáthiák

HCM

DCM

RCM

Aritmiák (channelopáthiák)

LQTS (60%-ban ismert mutáció, AD vagy AR)

SQTS

Brugada sy (csak 18-30%-ban ismert mutáció)

CRVD

Gén alapú diagnosztika I.

Hosszú QT szindróma (LQTS)

- Genotipizált betegek 40-45%-ában káliumcsatorna alfa alegység mutáció (KCNQ1) mutáció
- Nátrium csatorna alegység mutáció (SCN5A), gain of function

QT intervallum hossza nem függ a genotípustól, de a **T hullám morfológiája** jellemző lehet.

Mutációtól függő malignus aritmia-trigger

- 1-es típusban fizika, vagy emocionális stresszre
- 3-as típusban nyugalomban (Brugada sy hasonlóság)

Gén alapú diagnosztika I.

Monogénesen öröklődő CV betegségek (folytatás)

Zsíryanycsere betegségei
FH (LDLR, ApoB)

Coagulopáthiák
V faktor gén mutáció (Leiden)
Prothrombin gén

Gén alapú diagnosztika II.

Multifaktoriális CV betegségek rizikója

Single Nucleotid Polymorfizmusok (SNP)

- Gyakori humán genetikai varianciák (>1%-os előfordulás)
- Az aminosavcsere nem okoz manifeszt kóros eltérést
- Szerepük kóros állapotokban és gyógyszeres kezelés során lehet jelentős

Gén alapú diagnosztika II.

Multifaktoriális CV betegségek rizikója (folytatás)

Renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer

Myocardiális infarctus kialakulásának gyakorisága az ACE insertió/deléción (I/D) polymorfizmusban (DD genotípus) szignifikánsan nagyobb, 9 éves utánkövetésnél azonban nem volt túlélésbeli különbség.

BMC Med Genet. 2007 May 22;8:27.

Gén alapú diagnosztika II.

Multifaktoriális CV betegségek rizikója (folytatás)

ApoE gén

-E2 allél csökkenti, E4 növeli az összkoleszterin szintet
Meta-analízis az ApoE4 allélt hordozókban az
összpopulációhoz képest 40-50%-kal megnövekedett
cardiovaszkuláris rizikó növekedést jelez, igen jelentős
szubpopulációs eltérésekkel.

Am J Epidemiol 2002;155:487–95.

Coaguláció

Meta-analízis (191 vizsgálat) alapján a **prothrombin
gén** 20210A variáns és az **V-ös faktor** 1691A
szignifikánsan növeli a coronáriabetegség rizikóját.

Lancet. 2006 Feb 25;367(9511):651-8.

Gén alapú diagnosztika III.

Farmakogenomika

ACE polymorfizmusok

Béta receptor polymorfizmusok

Myocardium rejekció vizsgálata PBMC génexpresszióval
(**GEP**: ITGAM, FLT3, IL1R2, G6B, PF4, WDR40A, MIR, ARHU, PDCD1,
ITGA4, SEMA7A)

Genetikai varianciák hatása a gyógyszeres kezelésre (pl.)

Hypertónia kezelése metoprolol monoterápiával
Ser (49) és **Gly (389)** homozigóták terápia rezisztensek

Clin Pharmacol Ther 80:23-32,2006

Béta blokkoló kezelés melletti bal kamra EF javulás és EDD csökkenés *szívelégtelen Arg (389)* homozigóta (vs hetero és Gly (389) homozigóta) és **Gly (49)** homozigóta (vs hetero és Ser (49) homozigóta) betegekben jelentősebb.

Pharmacogenetics Genomics 15:227-234,2005

Genetikai tesztek általános indikációi és haszna

Klinikailag gyanított diagnózis megerősítése.

Tünetmentes egyének betegségekre való hajlamának vizsgálata

Tünetmentes, de a mutáns gént gyaníthatóan hordozó (magas kockázatú) egyének vizsgálata (gyermekük rizikójának felmérésére, családtervezés).

Gén alapú diagnosztika lehetőségei a CV prevencióban

Európai CV prevenció guideline

Családi anamnézis, Fenotípus szűrés,
Genotipizálás (polymorfizmusok: *ApoE, ACE, PAI-1, CETP*,
monogénes betegségek: *CM, aritmiák, LDLR, V faktor mut.*)

EJCV Prev Rehab 2003 Dec, 10 (Suppl 1):S1-78

Sportolók szűrése

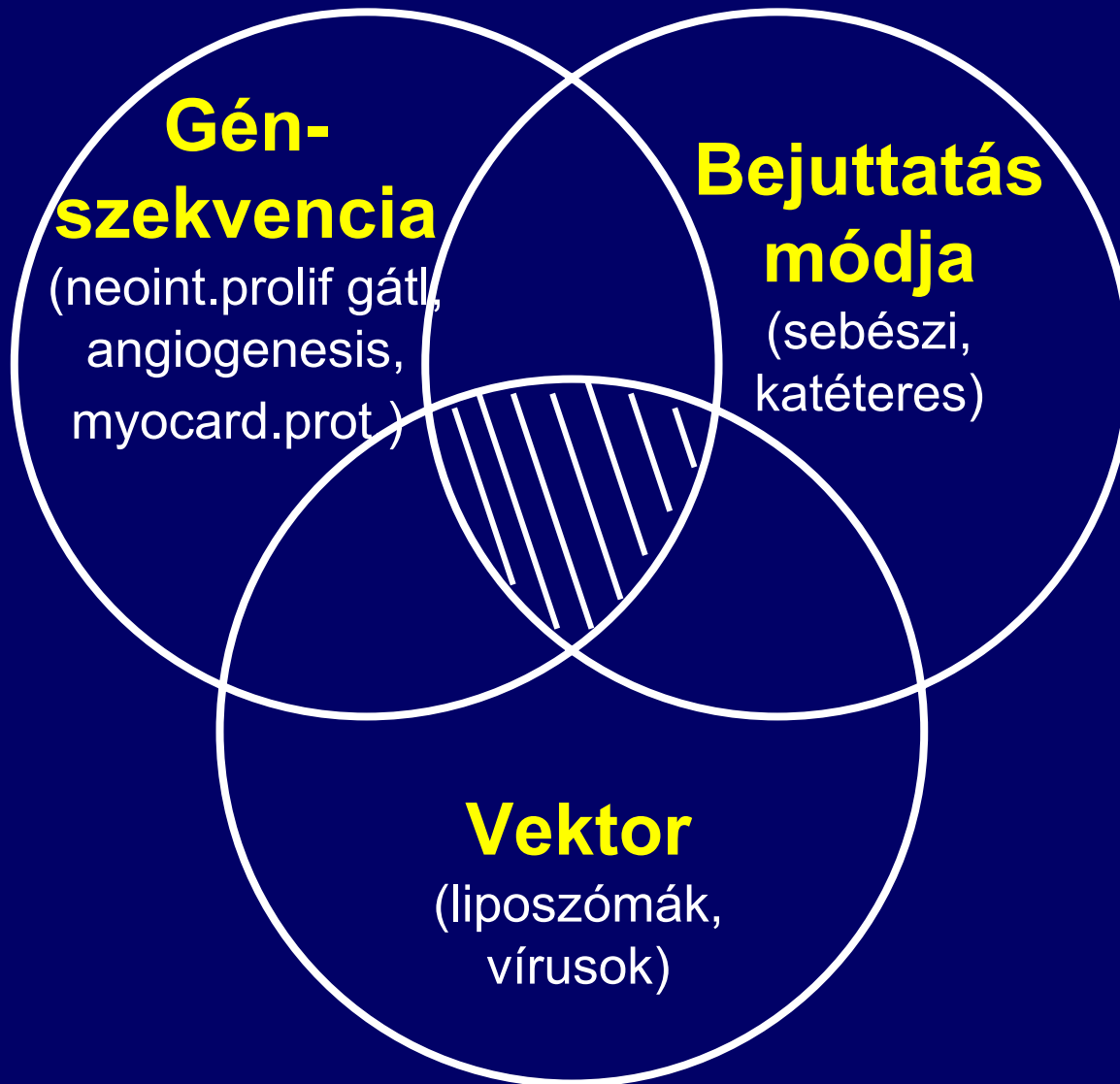
Fiatal sportolók hirtelen halálának 7 leggyakoribb oka közül
4-nek ismert genetikai oka van (Brugada sy, HCM, LQTS,
Marfan sy)

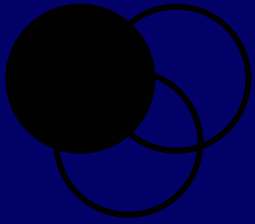
Am Fam Physician 2007, 75:1008-1014

Gén alapú CV terápia

Biológiailag aktív, idegen génszakaszok bejuttatása a cardiovascularis sejtekbe.

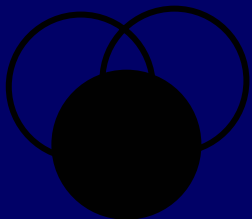
Gén alapú CV terápia pillérei





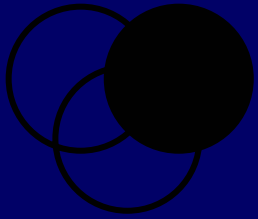
Génszekvenciák kiválasztása

- Neointima képződés gátlása
 - Angiogenikus potenciál
 - Direkt kardioprotekció
 - Pozitív inotróp hatás



Vektorok

	Nukleotid kapacitás (kB)	Célsejtek	kromoszóma integráció	Expresszió időtartama	Szöveti gyulladás
“Csupasz” DNS	>10	Harántcsíktolt izom, máj- és szívizomsejt	nincs	tranziens	alacsony
Liposzóma	>10	sejtek többsége	nincs	tranziens	alacsony
Herpesz szimplex vírus	~25	Szenzoros ganglion neuronjai	Extra-kromoszomalis	tranziens	alacsony
Adenovírus	7-8	Osztódó és nem osztódó sejtek	nincs	tranziens	magas
Adeno-asszociált vírus	<5	sejtek többsége	van	stabil	alacsony
Lentivírus	<8	Osztódó és nem osztódó sejtek	van	stabil	alacsony



Kardiovaszkuláris génbejuttatási stratégiák

ex vivo

vénagraftok injektálása (*Alexander et al, JAMA, 2005*)

sebészi

intramyokardiális injektálás (*Rosengart et al, Circulation, 1999*)

perkután

intra-murális (*Kastrup et al, JACC, 2005*)

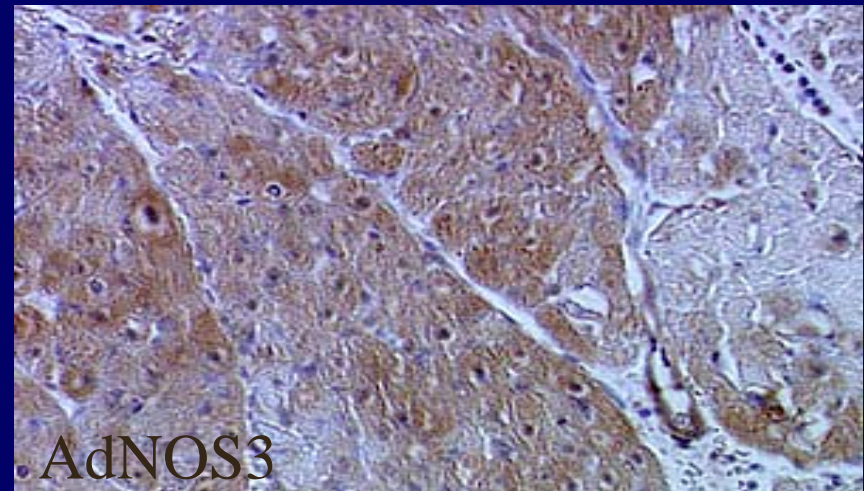
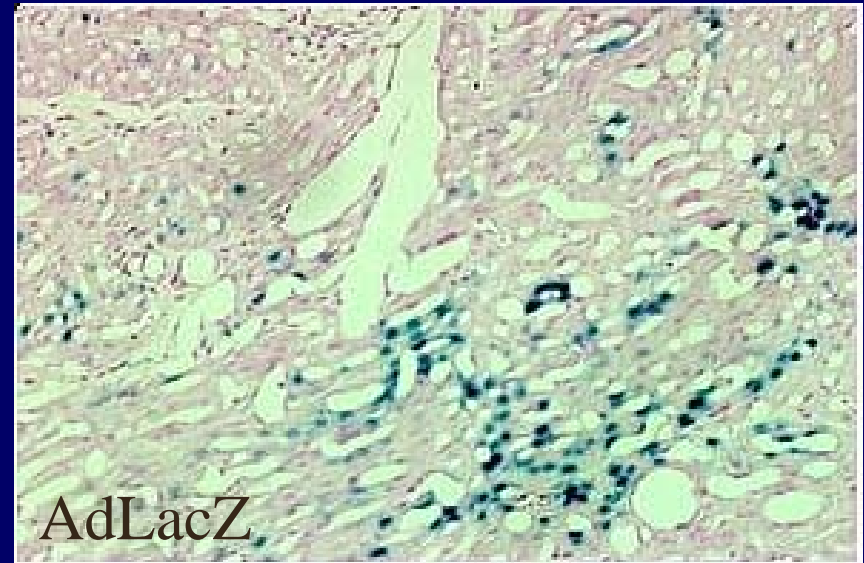
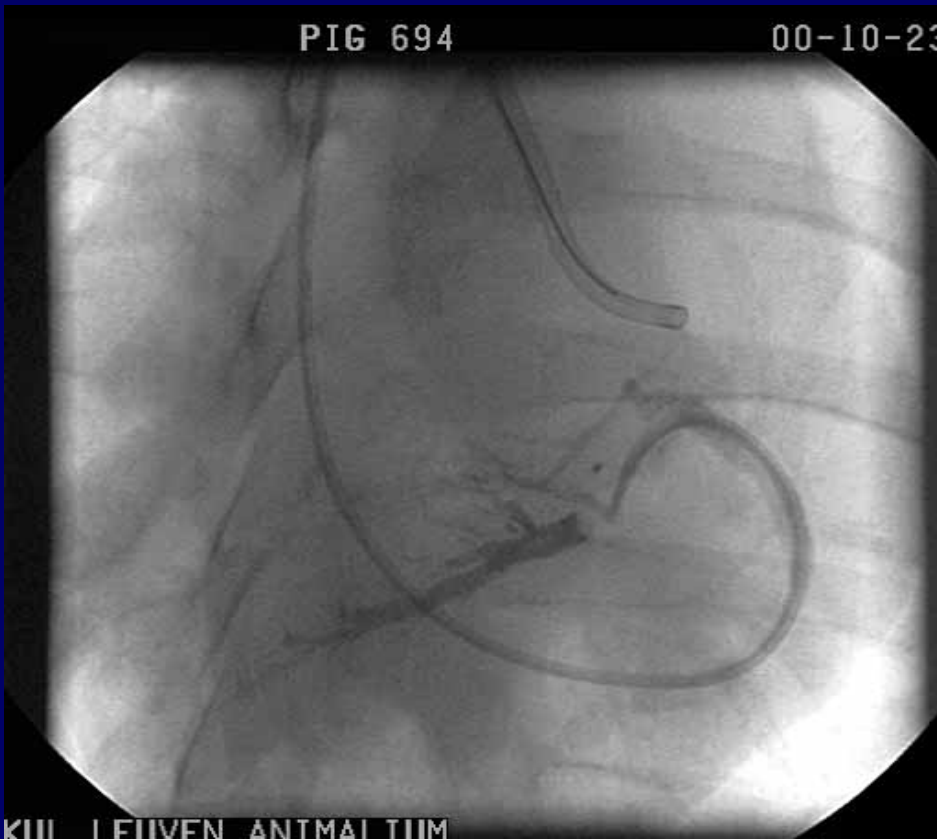
sztenthez kötött génszekvenciák (*Klugherz et al, HGT, 2002*)

intra-koronária artériás injektálás (*Grines et al, Circulation, 2003*)

intra-perikardiális injektálás (*Fromes et al, GT, 1999*)

retrográd koronária véna injektálás (*Szelid et al, HGT, 2002*)

Myocardium géntranszfer sertésben



Gén alapú terápia

Előnyei

Tartós, hatékony, lokális biológiai hatás

A vektor stabil és mutáció nélküli genomi integrációja a cardiovascularis sejtekben

Szöveti toxicitás hiánya

Bejuttatandó génszakaszok egyszerű előállíthatósága

Új szöveti struktúrák létrehozása (pl. angiogenesis)

Hátrányok

Immunválasz (megfelelő vektorok kifejlesztése)

Szisztémás hatás (daganat, retinopáthia)

Genomi integráció esetleges veszélyei

Replikáció kompetens vírusok kialakulása

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei

- Vaszkuloproliferatív betegségek
- Ischaemiás szívbetegség

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei

Vaszkuloproliferatív betegségek

In-szent resztenózis gátlása:

Állatkísérletekben biztató eredmények in-szent sztenózis csökkentésében érfali nitrogén oxid szintáz, hem oxigenáz géntranszferrel.

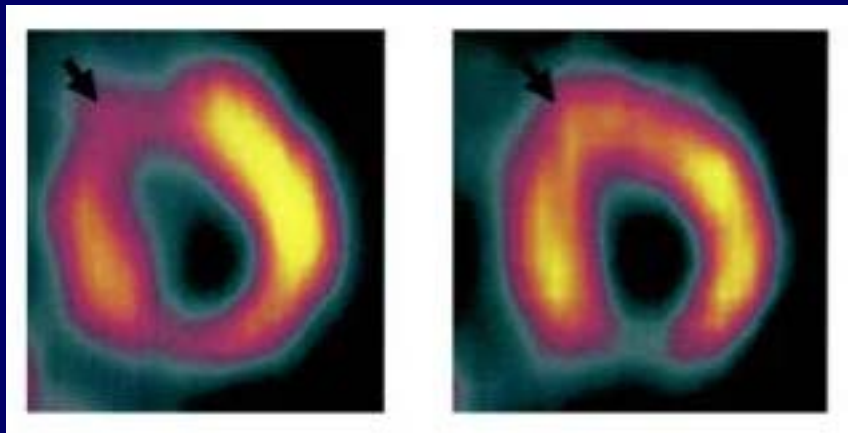
Simaizom proliferáció gátlása c-myc protoonkogén blokkolásával. Szentelést követően blokkoló oligodeoxynukleotid szekvencia injektálása betegekben (n=85) a koronária falba. IVUS, QCA – negatív eredmény

(Kutryk et al, J Am Coll Cardiol, 2002)

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei: Vaszkuloproliferatív betegségek

In-szent reztenózis gátlása:

VEGF adenovirus és liposzóma mediált injektálása az érfalba koronária angioplasztikat követően iszkémiás szívbetegekben (n=103). A reztenózis mértékét nem csökkentette szignifikánsan, a disztális szövetek perfúzióját viszont javította a VEGF GT a placebo kontrollhoz képest. (Kuopio Angiogenesis Trial II)



GT előtt

GT után 6 hónappal

(Hedman et al, Circulation, 2003)

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei: Vaszkuloproliferatív betegségek

Vénás graftelégtelenség gátlása (ex vivo):

NF-kappaB blokkoló DNS GT vénás graftban csökkentette a neointima kialakulását és a simaizom proliferáció mértékét kutyában.

(Shintani et al, Ann Thorac Surg, 2002)

E2F sejtciklust reguláló génszakaszt blokkoló DNS GT 12 hónapos utánkövetésnél csökkentette a graftelzáródás mértékét (n=41) a PREVENT vizsgálatban. (PREVENT IV 12-18 hónap =negatív)

(Mann et al, Lancet, 1999)

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei: Ischaemiás szívbetegség

Vaszkulogenezis: érképződés pluripotens sejtekből

Angiogenezis: érnövekedés meglévő erekből

Arteriogenezis: artériák növekedése meglévő erekből

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei: Ischaemiás szívbetegség

VEGF (Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor)

Specifikusan az endothel sejtekre hat, azok osztódását, migrációját és érhálózattá alakulását serkenti.

FGF (Fibroblaszt növekedési faktor)

Az endothel és a simaizom sejtek osztódását és migrációját is szabályozza. Potenciálisan arteriogenezist serkenthethet.

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei: Ischaemiás szívbetegség

A gén alapú kezelés versus **angiogenikus fehérje**

Stabil angina pectoris betegekben (n=178) VEGF fehérje intra-koronária injektálása.

Az anginák sűrűsége a placebo kontrollban is jelentősen csökkent, 4 hónap utánkövetésnél. Negatív vizsgálat. (VIVA trial)
(Henry et al, *Circulation*, 2003)

A fehérje injektálás veszélyei: szisztémás mellékhatások
(retinopathia, tumor)

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei: Ischaemiás szívbetegség

Iszkémiás szívbetegekben (n=19) perkután subendokardiális injektálással VEGF plazmidot juttattak be a bal kamra izomszövetébe.

A placebo kontrollhoz képest 3 hónapos utánkövetésnél az anginak sűrűsége lecsökkent.

Alacsony betegszám!!

(Losordo et al, Circulation, 2002)

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei: Ischaemiás szívbetegség

Adenovírus mediált géntranszfer intrakoronária injektálás során stabil anginás betegekben (n=52) biztonságos.

AdFGF-4 egyszeri injektálása nagy dózisban növelte a betegek terhelhetőségét és csökkentette a myocardium ischaemia mértékét (SPECT) 2 hónap utánkövetésnél. (AGENT-2 trial)

(Grines et al, J Am Coll Cardiol, 2003)

Kardiovaszkuláris génterápia eredményei: Hypertonia

Pro hypertenzív gének gátlása

ACE gén gátlás blokkoló DNS szekvenciákkal

(Wang et al. Circ Res, 1999)

Vazodilatátor génszakaszok injektálása

kallikrein, ANP, NOS3

Kisállatokban biztató kísérletek, de humán alkalmazással
fő probléma a tartós hatás elérhetetlensége

Genetikai diagnosztika jelentősége a kardiológiában

Klinikailag gyanított diagnózis megerősítése.

Tünetmentes egyének betegségekre való hajlamának vizsgálata (szűrővizsgálatok)

Tünetmentes, de a mutáns gént gyaníthatóan hordozó (magas kockázatú) egyének vizsgálata (gyermekük rizikójának felmérésére, családtervezés). Rendszeres kontroll vizsgálatok szükségtelessé tétele.

Gyógyszerek hatékonyságának vizsgálata

Kardiovaszkuláris génterápia perspektívái

A kardiovaszkuláris géntranszfer betegekben biztonságos.

Resztenózisban a biztató eredmények ellenére széleskörű vizsgálatok nem várhatóak, tekintettel az új sztent technológiákra

Iszkémiás szívbetegségben a gén alapú terápia viszont az eddigi, óvatosan biztató eredmények miatt teret nyerhet nagy klinikai vizsgálatokban is, akár őssejt terápiával kombinálva