

Az új-generációs szekvenálási technika alkalmazási lehetőségei az osteogenesis imperfecta és a Wilson kór klinikai diagnosztikájában

Doktori értekezés

Árvai Kristóf

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lakatos Péter

Hivatalos bírálók: Dr. Reismann Péter, PhD, egyetemi adjunktus
Dr. Karcagi Veronika, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kovács Gábor László, Ph.D., főorvos

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	6
1.1. Új-generációs szekvenálás - a forradalom	6
1.2. Osteogenesis imperfecta bevezetés	11
1.2.1. Az I-es típusú kollagén felépítése	11
1.2.2. Poszttranszlációs módosítások	12
1.2.2.1. Prolil 3-hidroxiáz komplex (P3h1/Crtap/CypB)	12
1.2.2.2. Lizil-hidroxiáz komplex (Plod2/Fkbp10)	13
1.2.2.3. Serpinh1/Hsp47 rendszer	14
1.2.3. Kollagén szekréció és endoplazmatikus retikulum (ER) stressz	15
1.2.3.1. Creb3l1	16
1.2.3.2. Mbtps2	16
1.2.3.3. Tric-b	17
1.2.4. Kollagén feldolgozása	17
1.2.5. Osteoblaszt differenciáció és mineralizáció	18
1.2.5.1. Wnt1	18
1.2.5.2. Sp7	19
1.2.5.3. Serpinf1	19
1.2.5.4. Ifitm5	20
1.2.6. Osteogenesis imperfecta és a TGF- β jelátviteli út kapcsolata	21
1.2.7. Az osteogenesis imperfecta klinikai megjelenése	23
1.2.8. Az osteogenesis imperfecta típusainak osztályozása	24
1.2.9. Az osteogenesis imperfecta kezelésének lehetőségei	27
1.3. Wilson-kór bevezetés	32
1.3.1. Az ATP7B felépítése és funkciója	35
1.3.2. Az ATP7B gén mutációi	37
1.3.3. Genotípus-fenotípus összefüggések	38
1.3.4. Klinikai diagnosztikai megközelítések	40
1.3.5. Molekuláris diagnosztikai megközelítések	42
1.3.6. A Wilson-kór kezelése	43

2.	Célkitűzések	45
3.	Módszerek	47
3.1.	Génpanelek kialakítása	47
3.2.	Biológiai minták gyűjtése	49
3.3.	DNS izolálása	49
3.4.	Agilent HaloPlex könyvtár készítés	50
3.5.	AmpliSeq könyvtár készítés	54
3.6.	DNS könyvtárak koncentrációjának meghatározása	57
3.7.	Templát preparálás automata emulziós PCR (emPCR) felhasználásával	58
3.8.	Új-generációs szekvenálás Ion Torrent PGM készüléken	61
3.9.	Bioinformatikai elemzés	63
3.10.	A talált Patogén mutációk megerősítése Sanger-szekvenálással	64
4.	Eredmények	65
4.1.	Páciens adatok	65
4.2.	A szekvenálási adatok minőségi ellenőrzése	68
4.3.	Osteogenesis imperfectával diagnosztizált beteganyagban talált mutációk	70
4.4.	Wilson-kórral diagnosztizált beteganyagban talált mutációk	74
5.	Megbeszélés	77
6.	Következtetések	86
7.	Összefoglalás	89
8.	Summary	90
9.	Irodalomjegyzék	91
10.	Saját publikációk jegyzéke	112
11.	Köszönetnyilvánítás	116

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3Hyp	3-hidroxi-prolin
ATF4	Activating transcription factor 4
ABI	Applied Biosystems
ACMG	American College of Medical Genetics
AD	autoszomális domináns
AR	autoszomális recesszív
ATF6 α	Activating transcription factor 6 alpha
ATOX1	Antioxidant 1 copper chaperone
ATP7A	ATPase copper transporting alpha
ATP7B	ATPase copper transporting beta
BAM	Binary version of a SAM file
BMD	Bone mineral density
Bmp1	Bone morphogenetic protein 1
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
BP	Biszfoszfonát
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
COL1A2	Collagen, type I, alpha 2
COMMD1	Copper metabolism domain containing 1
CPC	cisztein-prolin-cisztein
Creb3l1	cAMP responsive element binding protein 3 like 1
Crtap	Cartilage associated protein
CTR1	Copper transporter 1
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DHPLC	Denaturing high performance liquid chromatography
DMT1	Divalent metal transporter 1
DNS	Dezoxiribonukleinsav
ECM	Extracelluláris mátrix
eIF2 α	Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha
Fkbp10	FK506-binding protein 10
GATK	Genome Analysis Toolkit
HGMD	Human Gene Mutation Database
HP	Hidroxilizil-piridinolin
Hsp47	Heat shock protein 47
Hyl	Hidroxilizin
IFITM5	Interferon induced transmembrane protein 5
IRE1 α	Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1
IU	International Unit
KFR	Kayser-Fleischer ring

LAP	Latency-associated peptide
LEPRE1	Leucine- And Proline-Enriched Proteoglycan 1
LH1-3	Lizil-hidroxiláz 1-3
LOX	Lizil oxidáz
LP	Lizil-piridinolin
LRP5	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5
LRP6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6
LTBP	Latent transforming growth factor beta binding protein
MBD6	Methyl-CpG Binding Domain Protein 6
MBTPS2	Membrane Bound Transcription Factor Peptidase, Site 2
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate reductase
NGS	Next-generation sequencing
NHGRI	National Human Genome Research Institute
OI	Osteogenesis imperfecta
OPPG	Osteoporosis-pseudoglioma szindróma
P3H	Protil 3-hidroxiláz
P3h1	Protil 3-hidroxiláz 1
PCR	Polymerase chain reaction
PEDF	Pigment epithelium-derived faktor
PERK	(PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PGM	Personal Genome Machine
Plod1-3	Procollagen-Lysine,2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 1-3
PLOD2	Procollagen-Lysine,2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
PRNP	Prion protein
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SAM	Sequence Alignment Map
Serpinf1	Serpin family F member 1
Serpinh1	Serpin family H member 1
SIFT	Sorting Tolerant From Intolerant
SMAD2/3	SMAD family member 2/3
SOLiD	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection
Sp7	Sp7 transcription factor
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
TGF- β	Transforming growth factor beta
Tll1	Tolloid-like 1
TMAP	Torrent Mapping Alignment Program
TMEM38B	Transmembrane Protein 38B
Tric-b	Trimeric intracellular carion channel type B

UCSC	University of California, Santa Cruz
ULN	Upper limit of normal
UPR	Unfolded protein response
UPRE	Unfolded protein response element
VCF	Variant Call Format
VUS	Variant of uncertain significance
Wnt1	Wnt family member 1
XPB1	X-box binding protein 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

1. BEVEZETÉS

1.1. ÚJ-GENERÁCIÓS SZEKVENÁLÁS - A FORRADALOM

Az 1970-es években Sanger és kutatótársai kifejlesztették a fragmentáción és lánctermináción alapuló DNS szekvenálási technikát [1]. Ezzel kezdetét vette a molekuláris biológia átalakulása, mert rendelkezésre állt az az eszköz, ami lehetővé tette eleinte teljes gének, majd teljes genomoknak is a vizsgálatát. A Sanger-által megalkotott, és ma már Sanger-szekvenálásnak nevezett technika kevesebb mérgező vegyszert vagy radioizotópot alkalmazott, mint a Maxam és Gilbert nevéhez köthető módszerek [2] és emiatt a genomika meghatározó eszköze lett, közel 30 éven át.

A növekvő igények és az áteresztőképesség növelésére tett erőfeszítések eredményeként kiépültek olyan központok, ahol több száz szekvenátor dolgozott, párhuzamosítva és automatizálva. Ezeknek a fejlesztéseknek volt köszönhető, hogy 2004-ben elkészülhetett az első, teljesnek mondható humán genom szekvenciája [3].

A Humán Genom Project hatalmas anyagi, időbeli és emberi ráfordítást igényelt, a történelem legnagyobb szabású biológiai-orvosi együttműködését és 3 milliárd dollárt felemésztve. Ez egyértelművé tette, hogy valamilyen új technológiára van szükség a DNS szekvencia megállapítására, mely nagyságrendekkel gyorsabb és olcsóbb is egyben. Emiatt a National Human Genome Research Institute (NHGRI) egy pályázatot írt ki, mely célul tűzte ki a teljes humán genom vizsgálati költségének 1000\$ alá való leszorítását, 10 éven belül [4]. Ezzel kezdetét vette a gyűjtőnéven új-generációs szekvenálásnak (NGS) nevezett technológiák fejlesztése és versenye. Ezen módszerek közös jellemzője, hogy a masszív párhuzamosítás miatt egyidőben több százezer vagy akár millió bázis sorrend meghatározás zajlik le, közvetlen detekcióval, gélelektroforézis nélkül. A párhuzamosítás ilyen szintű volumene miatt nagy méretű genomi területek vizsgálata is korábban nem látható sebességgel vált kivitelezhetővé, miközben az egy nukleotid meghatározáshoz szükséges költség a töredékére esett vissza.

Az új-generációs szekvenálási technológia hátulütője azonban a relatíve rövid szekvenciák előállításának képessége, mely a de novo genom összeillesztést még nehezebbé tette, illetve teljesen új programok és algoritmusok kifejlesztését tette szükségessé.

Az első, piacképes készülék 2005-ben jelent meg, a 454 Life Sciences fejlesztésében (a fejlesztőcéget a Roche felvásárolta) [5]. A készülék piroszekvenálási technológiát alkalmazott, melynek lényege, hogy a kiegészítő DNS szál szintézise során pirofoszfát szabadul fel, egy detektálható fényjelenség kíséretében. A kezdeti reagenskészlettel a szekvenátor 200 000 szekvencia előállítására volt képes, azok átlagos hossza pedig 110 bázispár volt. A Roche jelentős fejlesztései árán a kései modellek 1 millió, 400-1000 bázispár hosszúságú leolvasás előállítására voltak képesek, azonban bizonyos technológia korlátok (homopolimer szekvenciák hosszának pontatlan meghatározása) és az igen éles piaci verseny miatt 2013-ban a tulajdonos kivezette a technológiát a kereskedelmi forgalomból és 2016-ban a támogatását is megszüntette.

Egy évvel a 454 piroszekvenátora után megjelent a Solexa (2007-ben vásárolta fel az Illumina) készüléke, mely csupán 35 bázispár hosszú szekvenciák generálására volt képes, azonban azokból egyszerre 30 millióra (mostanra 20 milliárd, 150 bázispár hosszúságú leolvasás a maximális képessége a legújabb gépeknek). A kémiai reakció során a szálszintézis reverzibilis terminációval történik, a nukleotidokat pedig négyféle szín jelöli (ma már két- és egyszín kémiaiák is léteznek). A bázis inkorporációt és detekciót követően a terminátor és a fluorofór hasításra kerül, majd a ciklus megismétlődik. Napjainkban ez a technológia és az Illumina cég lett a szekvenálási piac domináns szereplője.

2007-ben lépett be a versenybe az Applied Biosystems (ma Thermo Fischer Scientific) oligo-ligáció detekción alapuló szekvenálásra (SOLiD) képes készüléke [6], mely hasonlóan rövid DNS szakaszok meghatározását végezték, azonban már a kezdeti áteresztőképessége is elérte a 100 millió szekvenciát, mely 2009-re 1 milliárd fölé emelkedett, azonban a palindrom szekvenciák bázissorendjének megállapítása problémás volt.

2010-ben jelent meg az Ion Torrent (ma a Thermo Fischer Scientific része) Personal Genome Machine (PGM) nevű szekvenátora, mely fő fejlesztője a 454 Scientific alapítója volt. A gép nem tartalmazott drága kamerarendszert és a szekvenálási reakcióban felhasznált nukleotidok sem hordoztak kémiai módosításokat a természetes formához képest. Ez egy kisebb, olcsóbb és gyorsabb készülék kifejlesztését tette lehetővé, az első „asztali” szekvenátor megjelenését. Az Ion Torrent akvizícióját követően az akkor tulajdonos Life Technologies megszüntette a SOLiD készülékek további támogatását. Az

első verziók 100 bázispár hosszúságú leolvasásokat generáltak, félvezető szekvenálási technika alkalmazásával. Ma már lehetőség van akár 600 bp hosszú szekvenciák előállítására is, a maximális kapacitás pedig elérte a 130 millió leolvasást. A disszertációban később még részletesen ismertetésre kerül a félvezető szekvenálás, mivel vizsgálatainkat ezen a platformon végeztük (1. ábra).



1. ábra: A jelenleg elérhető Ion Torrent szekvenátorok. Bal oldalon látható a PGM (maximum 6 millió szekvencia), míg jobbra az S5 (maximum 130 millió szekvencia) készülék.

2014-ben került bemutatásra az Illumina HiSeq X-Ten készüléke, mely elsőként érte el az ezer dolláros humán genom szekvenálási költséget (amennyiben a készülék folyamatosan és teljes kihasználtságon üzemel), pontosan tíz évvel a Humán Genom Project elkészülte után. Ez azonban nem tartalmazza a bioinformatika költségét, illetve maga a készülék és a szükséges infrastruktúra több millió dolláros beruházást igényel.

A harmadik generációs szekvenátoroknak nevezett gépek már képesek egyetlen DNS molekula szekvenciájának meghatározására (single molecule sequencing), valós időben [7]. A technológia roppant nehezen és korlátozottan alkalmazható, jelenleg a Pacific Biosciences készüléke az úttörő, mely több ezernyi, több tíz kilobázis hosszúságú leolvasás előállítására képes. Jelenleg ez az egyetlen olyan szekvenálási módszer, mely alkalmas bizonyos komplex, vagy repetitív genomi régiók vizsgálatára.

Az új-generációs szekvenáló technikák általános tulajdonsága, hogy az adott pozícióban megállapított nukleotid minőségi mutatója (quality score) alacsonyabb, mint a tradicionális Sanger-szekvenálás során nyert nukleotid információé. A Humán Genom Project során került kifejlesztésre a Phred-féle quality score, mely logaritmikus skálán mutatja meg, hogy a megállapított nukleotid mekkora valószínűséggel helyes [8].

A $Q = -10 \log_{10} P$ formula gyorsan és széleskörben terjedt el a minőségi értékek megállapítására. Értelmezése egyszerű, a logaritmikus skála miatt, ha a Phred-féle quality score 10, az azt jelenti, hogy a hibás nukleotid megállapításának esélye 1:10, vagyis a meghívott nukleotidok 90%-a lehet helyes. A pontszám megállapításához az algoritmus a mért értékek számos paraméterét vizsgálja, illetve a mért értékek összehasonlítását végzi a várható értékével. A mai szekvenálási technikák jellemzően a Q30-as érték közelében teljesítenek, vagyis a pontosságuk 99.9% és a hibás bázisok előfordulásának valószínűsége 1:1000. Ez meglehetősen pontos szekvencia meghatározásnak tűnhet, azonban, ha több millió szekvenciát (és ezzel több milliárd bázis információt) generál a készülék egy-egy szekvenálási futás során, akkor a hibás bázisok előfordulása nem elhanyagolható. Ezért van szükség arra, hogy a vizsgálni kívánt célerületet ne egyszeresen, hanem többszörösen is megszekvenáljuk, aminek eredményeként a hibás bázisok véletlenszerűen fognak megjelenni (illetve a készülékre jellemző error-modell szerint), míg a valós pozitív eltérések feldúsulnak az adott genomi pozícióban. Az egy adott ponthoz illeszthető szekvenciák számát nevezzük lefedettségnek.

Mindezen laboratóriumi technikák drámai fejlődése alapjaiban változtatta meg a genomikai kutatások és klinikai genetikai diagnosztikák lehetőségeit, menetét. Korábban nem volt lehetséges teljes humán gének vagy akár kódoló genomok gyors és költséghatékony vizsgálatára. Ezzel együtt lehetővé vált korábban nem diagnosztizálható szindrómák genetikai alapjainak a felfedezése és nagyobb betegcsoporton való validációja.

Ezek a felfedezések és technológiai-informatikai fejlesztések vezettek a molekuláris és humán genetika forradalmához, mely elvezethet a valóban személyre szabott, precíziós orvoslás korába.

Vizsgálataink során az Ion Torrent szekvenálási technikáját alkalmaztuk olyan, örökletes megbetegedések vizsgálatára, melyek ismereteink szerint nagyobb számú kódoló szakasszal rendelkező génhez (Wilson-kór) vagy génekhez (osteogenesis imperfecta)

kapcsolhatóak, és emiatt a hagyományos szekvencia meghatározással a diagnosztikus eljárás gyakran igen hosszú időt vesz igénybe, magas költségigény és leletáfordulási idő mellett. Továbbá ezen betegségek fenotípusai átfedhetnek más szindrómák tüneteivel is, így a genetikai vizsgálat a differenciál diagnózis szempontjából is fontos információkat adhat.

1.2. OSTEOGENESIS IMPERFECTA BEVEZETÉS

Az osteogenesis imperfecta (OI) egy örökletes, kötőszöveti megbetegedés, változatos fenotípusos megjelenéssel. Gyakran nevezik „üvegsont” betegségnek is. A súlyosan érintettek sokszoros csonttöréseket szenvednek minimális- vagy trauma nélkül. A legsúlyosabb formája perinatálisan letális. Enyhe megjelenésében csak korai osteoporosist, vagy súlyosabb postmenopauzális csont ásványi anyag tartalom csökkenést okoz.

Az OI incidenciája körülbelül 1 per 10 000 - 20 000 élve születés [9] [10]. Ezzel az előfordulási aránnyal az Európai Unióban ritka betegségnek számít (kevesebb, mint 5 beteg, 10 000 főből) [11].

A tünetegyüttes elsősorban a csontrendszert érinti, de megfigyelhető a fogak kóros fejlődése (dentinogenesis imperfecta), az arckoponya rendellenességei és az ízületek hipermobilitása. A vázrendszeren kívül előfordulhat a sclera kék elszíneződése, a hallás sérülése, illetve tüdő abnormalitások. [4] A betegség elsődleges oka az 1-es típusú kollagént kódoló két gén (COL1A1 és COL1A2) egyikének a hibája, mely az esetek közel 90%-ánál áll a szimptómák háttérében. [12] A kollagén fehérje egy heterotrimer, két $\alpha 1$ (I) és egy $\alpha 2$ (I) láncból épül fel. Először egy prokollagén molekula szintetizálódik, ami számos poszttranszlációs módosításon megy keresztül. Azok a mutációk, amik a propeptid molekulák hasítási helyeit érintik, egyedi fenotípusokat, és az osteogenesis imperfecta specifikus típusait hozzák létre [13]. Az esetek körülbelül 10%-át az olyan génekben bekövetkező, recesszív módon öröklődő mutációk okozzák, melyek a kollagén poszt-transzlációs módosítását, szekrécióját és feldolgozását szabályozzák, illetve ide tartoznak még az osteoblasztok differenciációját, illetve a csont mineralizációját befolyásoló gének elváltozásai miatt létrejövő megbetegedések.

1.2.1. Az I-es típusú kollagén felépítése

Az egyes típusú kollagén helikális doménje elsődlegesen glicin és prolin vagy hidroxiprolin aminosavak ismétlődéséből épül fel [14]. A helikális domént két globuláris rész veszi körül, az N- és C-propeptidek, melyek eltávolításra kerülnek a kollagén összeszerelődése során [15]. Az OI leggyakoribb oka ebben a helikális doménben

található glicin aminosavak kicserélődése más aminosavakra, melyek hatással lesznek az egyes típusú kollagén hélixének kialakulására. Az $\alpha 1(I)$ lánc helikális részében bekövetkező glicin kicserélődések okozzák a legsúlyosabb fenotípussal járó betegséget, köztük a magzati letalitással járó formákat is. Az $\alpha 2(I)$ lánc hélixének sérülése kevésbé súlyos tüneteket okoz. A prokollagén felépítése a C-propeptid felől kezdődik, így az ebben a régióban lévő glicin aminosavak megváltozása hatással lehet a láncok asszociációjára és a fehérje térszerkezet kialakulására (folding), ezáltal okozva az osteogenesis imperfectát.

1.2.2. Poszttranszlációs módosítások

A kollagén szintézis során a naszcens egyes típusú prokollagén molekulák az endoplazmatikus retikulumba transzlokálódnak, ahol többféle poszttranszlációs módosításon esnek át (lizil- és prolil hidroxiláció), melyek elengedhetetlenek a megfelelő kollagén szintézis, transzport és stabilitás szempontjából. Az érés további folyamata során ezek a módosítások a lizil oxidáz szubsztrátjául szolgálnak, mely specifikus elhelyezkedésű lizin aminosavakat konvertál lizil-piridinolinná (LP), vagy a hidroxilizin oldalláncokat alakítja át hidroxilizil-piridinolinná (HP). Ezek hozzák majd létre a kollagénláncok közötti keresztkötéseket [16]. A lehetséges poszttranszlációs módosításokat az 2. ábra mutatja be.

1.2.2.1. Prolil 3-hidroxiláz komplex (P3h1/Crtap/CypB)

A prolil 3-hidroxiláz 1 (P3h1, melyet a LEPRE1 gén kódol) a prolil 3-hidroxiláz (P3H) enzimek közé tartozik, amely a 2-oxoglutarát dioxigenáz domént tartalmazó enzimek nagyobb csoportjába tartozik. Elsőként csirke embrióból izolálták a fehérjét és azt figyelték meg, hogy a tisztítási eljárás során együtt marad a cartilage associated proteinnel (Crtap) és a Cyclophilin B-vel (CypB, melyet a PPIB gén kódol), azokkal egy egységet alkot [17].

Ez a P3h1 komplex egyetlen prolint konvertál hidroxiprolinná az egyes típusú prokollagén helikális régiójában (Pro986 az $\alpha 1(I)$ - és Pro707 az $\alpha 2(I)$ láncban, 3-hidroxiprolinná (3Hyp) [18]. A homozigóta deléciója a Crtap fehérjének csökkenti a

3Hyp szintjét és csökkent csonttömeget, növekvő csont törékenységet és leromlott biomechanikai paramétereket eredményezett egerekben. Ezzel a megfigyeléssel összhangban azt találták, hogy a CRTAP, P3H1 és PPIB funkcióvesztő mutációi súlyos, recesszív módon öröklődő osteogenesis imperfectát okoznak [19-22]. Ehhez hasonlóan a Lepre *-/-* genotípusú egerek csontrendszeri abnormalitásokat mutattak: csökkent növekedés, osteopénia és csökkent csont erősség volt rájuk jellemző. Ezek alapján a P3h1 komplex és a 3-hidroxi-prolin elvesztése lehet a felelős az ilyen egerek fenotípusos tüneteierért [23]. Érdekes módon knock-in egerekben (melyek egy, a P3h1 katalitikus doménjében bekövetkező aminosavcsere miatt elvesztették a P3h1 enzim enzimátikus hatását, de az enzimnek megmaradt a Crtap-hoz való kötődés- és a P3h1 komplex formálási képessége) nem tapasztaltak növekedésbeli különbséget, csak osteopéniát [24].

A peptidil-prolil izomeráz (Ppib) homozigóta deléciója kisebb méretű egereket eredményezett, kyphosis-t és csökkent csonttömeget. Csökkent a P3h1 szintje is, a Crtap fehérjéé nem változott, mely eredmény arra enged következtetni, hogy a Ppib nélkülözhetetlen a P3h1 stabilitásában [25]. A 3-hidroxi-prolin hiánya nem befolyásolja a kollagén stabilitását, azonban hozzáférést biztosíthat más kollagén-modifikáló enzimeknek, mely a helikális domén túlzott módosításához vezethet az egyes típusú prokollagénben és növelheti a keresztkötések számát is [22]. Ez a túlzott módosítás megfigyelhető Lepre1 *-/-* és Crtap *-/-* egerekben, azonban a Ppib *-/-* genotípus esetén nem tapasztalták ezt a jelenséget, feltehetően azért, mert a P3h1-nek és a Crtap fehérjének kölcsönösen szükségük van egymásra a trimer komplex fenntartásában [26-27].

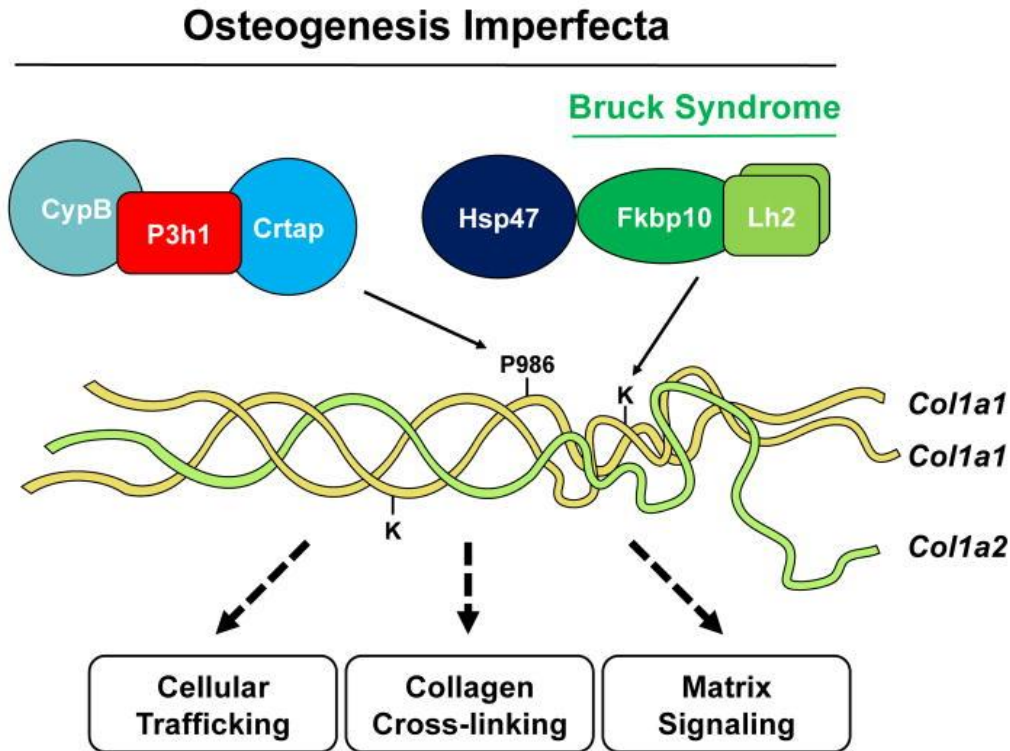
1.2.2.2. Lizil-hidroxiláz komplex (Plod2/Fkbp10)

A lizil-hidroxiláz 1-3 (LH1-3) fehérjét a prokollagén-lizin, 2-oxoglutarát 5-dioxigenáz 1-3 (PLOD1-3) gén kódolja a humán genomban. Feladata az, hogy a lizint hidroxilizinné (Hyl) konvertálja át, mely később a lizil oxidáz (LOX) enzimek szubsztrátjaként fog szolgálni és piridinolin keresztkötéseket hoz majd létre. A hidroxilizin oldalláncokat specifikus enzimek hozzák létre, attól függően, hogy a lizin hol helyezkedik el a

prokollagén molekulán belül. Például a PLOD1 a helikális Hyl kialakítását végzi, míg a PLOD2 a telopeptid részben végzi ezt el [28]. A PLOD2 funkcióvesztő mutációi osteogenesis imperfectát okoznak, az ízületek kongenitális megrövidülésével együtt. Ezen tünetek együttes előfordulását Bruck szindrómának nevezzük [29]. Ehhez hasonlóan az FKBP10 gén hibái szintén az OI és a Bruck szindróma fenotípusát hozzák létre, a prokollagén telopeptidben megfigyelhető, szignifikánsan csökkent mennyiségű lizil hidroxiláció és a láncon belüli keresztkötések eredményeként [30]. A hasonló fenotípusos tulajdonságok, a sejten belüli lokalizáció és az FKBP65 saját lizil-hidroxiláz funkciója miatt felmerült annak a lehetősége, hogy az FKBP65 és az LH2 egy komplex kialakításán át produkálja az enzimatis aktivitását [14,31], mely interakció sejt kultúrában megerősítést is nyert [32]. A kötődés specifikusnak bizonyult, az FKBP65 nem kapcsolódott sem az LH1, sem az LH3 gének termékeihez, azonban az LH2-vel való interakció pontos megértése további vizsgálatokat igényel, hasonlóan az Fbcp10 és a Plod2 kölcsönhatásának fiziológiai jelentőségnek feltérképezéséhez. Az Fbcp10 -/- genotípus egerekben perinatálisan letálisnak bizonyult, feltehetően a szövetek általános törékenysége vagy a tüdőfunkciók fejletlensége miatt [33].

1.2.2.3. Serpinh1/Hsp47 rendszer

A Hsp47 egy endoplazmatikus retikulumban lokalizálódó chaperon fehérje, mely részt vesz a kollagén tripla hélix megfelelő kialakításában. A Hsp47 knock-out embrionálisan letálisnak bizonyult a kollagénszintézis defektusa miatt. [66] A chaperon a kollagén tripla hélix stabilitását közvetlenül szabályozza, specifikus arginin oldalláncokhoz kötődve [34]. A HSP47 gén mutációja recesszív módon öröklődő OI-t okoz, a prokollagén molekulák aggregációja és késleltetett szekréciója révén [35]. A Hsp47 a kollagén poszttranszlációs módosításában közvetve vesz részt, azonban a gén hibája, állatkísérletek alapján, az egyes típusú kollagén túlzott módosítását és keresztkötések kialakulását okozza, anélkül, hogy hatással lenne a 3Hyp (Pro986) aminosavra [36]. Ez azt is jelenti, hogy a kollagén strukturális defektusa szerepet játszhat az abnormális poszttranszlációs modifikációk kialakulásában is. In vitro kísérletek alapján elképzelhető, hogy a HSP47 asszociálni képes az FKBP65/LH2 komplexszel is, de ez további megerősítésre vár még [35].



2. ábra: Az I-es típusú kollagén poszttranszlációs módosításában résztvevő gének. A P3h1 komplex hozza létre a 3-hidroxi-prolin aminosavat a 986. pozícióban az $\alpha(I)$ láncban és az Lh2 komplex pedig lizil-hidroxiláz aktivitásával hidroxilálja a telopeptid rész lizin oldalláncait. A P3h1 komplex defektusai osteogenesis imperfectát okoznak, míg az Lh2/Fkbp65 mutációi a Bruck szindróma megjelenésért felelnek, OI mellett. A leggyakoribb, domináns COL1A1 és COL1A2 génhibák mellett a kollagén kereszt-kötésében, szállításában és az extracelluláris mátrix szignalingjában bekövetkező változások állnak a betegség hátterében. [12]

1.2.3. Kollagén szekréció és endoplazmatikus retikulum (ER) stressz

Az újonnan szintetizálódó fehérjéknek megfelelő konformációs változásokon kell keresztülmenniük a szekréció előtt.

Ez a folyamat az endoplazmatikus retikulumban megy végbe. A fehérjék helytelen feltekeredése vagy a fehérjék túlzott szintézise ER stresszt okozhat és elindíthatja a

rendezetlen fehérje választ (unfolded protein response (UPR)), mely specifikus transzkripciós hatásokat okoz. A legjobban tanulmányozott UPR mechanizmusok a PERK-eIF2 α -ATF4, IRE1 α -Xbp1 és az ATF6 α jelátviteli útvonalakon találhatóak [37]. A közelmúltban sikerült olyan recesszív OI géneket azonosítani melyek patomechanizmusában szerepel az ER stressz és az UPR is.

1.2.3.1. Creb311

A cAMP response element-binding protein 3-like 1 (Creb311) egy leucin cipzár transzkripciós faktor, ami a CRAB/ATF családba tartozik. A Creb311 kifejeződése kifejezetten magas osteoblasztokban, egérmodellben a homozigóta deléciója osteopéniát okoz, a csökkent osteoblaszt működés eredményeként [38]. A Creb311 molekuláris funkciója ma tudásunk szerint kétféle: közvetlenül kötődik a COL1A1 gén promoter régiójában lévő UPRE-like szekvenciához, ezzel szabályozva az expresszióját, illetve úgy tűnik, hogy befolyásolja a mátrix fehérjék szekrécióját is [39]. A CREB3L1 káros mutációi recesszíven öröklődő OI-t okozhatnak, spontán csonttörésekkel [40].

1.2.3.2. Mbtps2

A Membrane-bound transcription factor protease, site 2 (Mbtps2) protein a Golgi membránban lokalizálódik, ahol az ER stresszre adott válaszként különböző fehérjéket hasít el, beleértve a Creb311 peptidet is. A MPTBS2 génben leírtak egy misszensz mutációt, mely a fehérje proteáz hatású katalitikus doménjében helyezkedik el, közepes vagy súlyos, X kromoszómához kötötten öröklődő, recesszív osteogenesis imperfectát okozhat. Ezzel együtt az osteoblasztok csökkent Creb311 hasítási aktivitást és csökkent LH1 szintet mutattak, alacsonyabb hidroxilációval a helikális lizin esetében, illetve magasabb LP/HP arány volt megfigyelhető [41].

1.2.3.3. Tric-b

A trimeric intracellular cation channel subtype B (Tric-b, emberben TMEM38B néven is ismert) fő funkciója az intracelluláris kalcium felszabadulás szabályozása [42]. A Tric-b $-/-$ genotípusú egerek nem sokkal a születés után elhalnak, a tüdő defektusa miatt. Az ilyen egerek születéskor szignifikánsan csökkent csont mineralizációt tapasztaltak [43]. Tric-b $-/-$ egerek alacsonyabb csont ásványianyag tartalmat mutattak, annak ellenére, hogy az alkalmazott BMP-2 kezelés hatására megnövekedett a kollagén fehérje akkumulációja a primer, csontüregből származó osteoblasztok endoplazmatikus retikulumaiban, mely a kollagén szekréció defektusára enged következtetni [43]. A TMEM38B funkcióvesztő mutációi középestől súlyos tünetekkel járó recesszív OI-t okozhatnak [44-46]. A kísérleti egerekben megfigyeltékhez hasonlóan, a mutációt hordozó emberi fibroblaszt sejtekben is az egyes típusú kollagén csökkent szintézise és szekréciója figyelhető meg [47]. Ahhoz azonban még további vizsgálatok is szükségesek, hogy a pontos mechanizmusát megérthessük, miként vezet a TRIC-B elvesztése a kollagén keletkezés defektusához.

1.2.4. Kollagén feldolgozása

A prokollagén molekulák N- és C-terminális doménjeinek proteolitikus feldolgozáson kell keresztülmenniük, a fibrilláris struktúra kialakulása érdekében [15]. A C-propeptid eltávolítása különösen fontos lépés, enélkül nem megy végbe a szerkezet átalakítása [48]. A keresztkötések létrejöttében kulcsfontosságú a telopeptid rész hidroxil-lizinjeinek lizil-oxidáz (LOX) enzimek általi oxidációja [14].

A bone morphogenetic protein 1 (Bmp1) egy szekretálódó prokollagén C-proteináz enzimet kódol, mely funkcionálisan elkülönül más, csont-indukáló BMP molekuláktól [49]. A prokollagénen kívül, a BMP1 proteáz aktivitást mutat LOX és egyéb, extracelluláris mátrix (ECM) fehérjékkel szemben is [50]. A Bmp1 $-/-$ knock-out egerek csökkent csontosodást mutatnak a frontális, parietális és interparietális koponya csontok esetében, de az axiális vázrendszer és a függesztőövek normális fenotípusúak [49]. A jellemző vázrendszeri tünetek hiánya valószínűleg a tolloid-like

1 (Tll1) reziduális proteináz-C aktivitását köszönhető, mert a Bmp1 és Tll1 együttes deléciója szignifikánsan csökkentett a csontok tömegét, hosszát és biomechanikai tulajdonságait a fokozott csont turnover következtében [51].

OI betegekben a BMP1 mutációi változatos hatással bírnak a csont tömegére, de minden esetben gyakori töréseket ismertettek, mely az egyes típusú kollagén C-terminális doménjének csökkent hasításának volt köszönhető [52-53]. Érdekes módon a hasított C-terminális karboxil propeptid befolyásolja a sejtek viselkedését, de további kutatások szükségesek annak megítéléséhez, hogy ez hatással van-e az OI patomechanizmusára [54].

1.2.5. Osteoblaszt differenciáció és mineralizáció

Az osteoblaszt sejtek a mesenchimális őssejtekből származnak és ezek a sejtek az elsődleges forrásai a csontba kerülő kollagének [55]. Az osteoblasztok proliferációjában, differenciációjában és funkciójában bekövetkező változások szignifikánsan befolyásolják a csont mennyiségét és minőségét is. Miután a csontképző őssejtek elvégezték a kollagén szekréciónak az extracelluláris mátrixba, többféle faktor is szabályozza a mineralizáció további folyamatát.

1.2.5.1. Wnt1

A WNT jelátviteli útnak kritikus szerepe van az osteoblasztok differenciációjának és funkciójának szabályozásában. Miután a WNT ligandjai bekötődtek a megfelelő receptorokhoz és ko-receptorokhoz, köztük a low-density lipoprotein receptor-related protein 5 vagy 6 (LRP5, LRP6)-hoz, a β -catenin a sejtmagba lokalizálódik és aktiválja a downstream elhelyezkedő célpontjait [55]. A WNT szignaling fontosságát elsőként az LRP5 funkcióvesztő mutációnak segítségével írták le, mely osteoporosis-pseudoglioma szindrómát (OPPG) okozott [56]. Ezzel szemben az LRP5/6 aktiváló mutációi a normálnál magasabb csonttömeget hoztak létre [57-58]. Az irodalomban jól dokumentált a WNT jelátvitel csontképzésre gyakorolt hatása, arról azonban keveset tudunk, hogy melyik ligandnak van a legnagyobb szerepe ebben. A WNT1 gén hibái szemidomináns öröklődésmenettel (a homozigóta mutációk súlyosabb fenotípussal

járnak együtt, mint a heterozigóta eltérést hordozók) megjelenő osteogenesis imperfectát okoznak. Ebből arra következtethetünk, hogy ennek a ligandnak, mind dózisének, mind időbeli kifejeződésének fontos szerepe van a WNT szignaling szabályozásában [59-60]. A Swaying egérmodellben (*Wnt1^{sw/sw}*) gyakori csonttöréseket, alacsony csonttömeget és csökkent csonterősséget lehet megfigyelni, a humán megfelelőjével megegyező módon [61].

1.2.5.2. Sp7

Az Sp7 egy cink-ujj motívumot tartalmazó transzkripciós faktor, ami esszenciális az osteoblasztok differenciációjában [62]. Az Sp7-null mutáns egerekben egyáltalán nem történik meg a csontok kialakulása, az osteoblasztok defektusa miatt, a posztnatális deléciója pedig enyhén csökkenti a csontok tömegét az őssejtek számának csökkenése miatt [63]. Az Sp7-ben bekövetkező leolvasási keret-eltolódást okozó (frameshift) mutációk recesszív OI-ért felelősek, ami enyhe csont deformitásokkal és visszatérő csonttörésekkel jár együtt [64].

1.2.5.3. Serpinf1

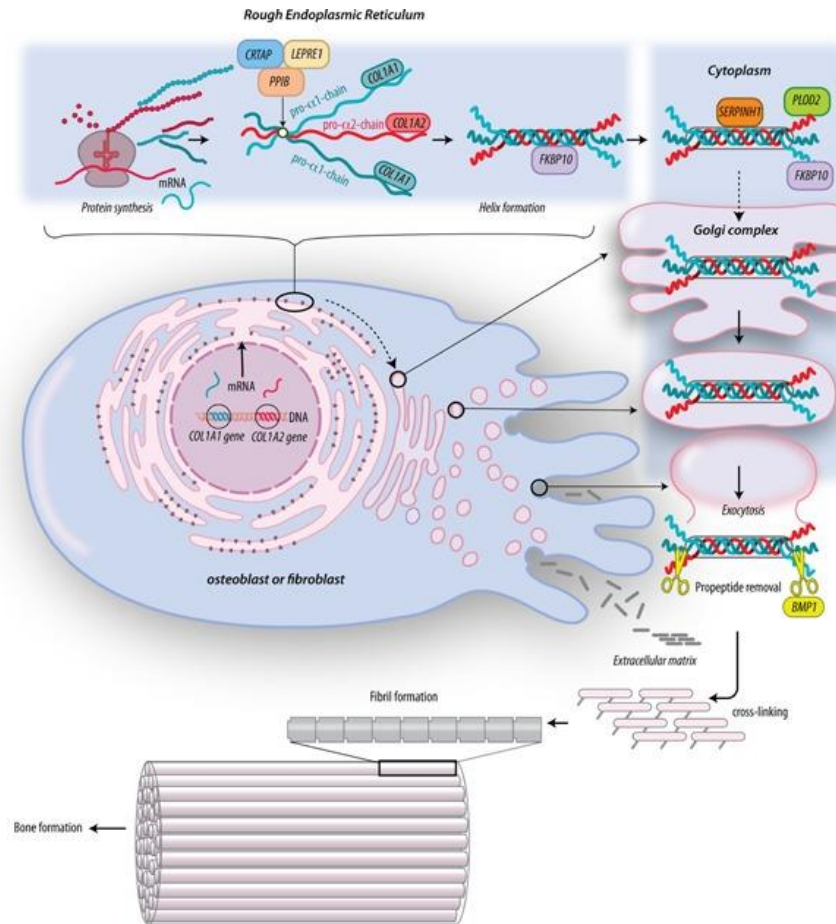
A Serpinf1 a pigment epithelium-derived faktort (PEDF) kódolja, ami egy szekretálódó glikoprotein és elsősorban a neuronális illetve angiogenezist gátló hatásáról volt ismert. A SERPINF1 káros mutációi VI. típusú, recesszív osteogenesis imperfectát okoznak, amire a hosszú csontok törése és ostemalacia miatt bekövetkező deformitások jellemzők [65-66]. Mivel a PEDF egy szekretált fehérje, amit elsődlegesen a máj állít elő, felmerült annak a lehetősége, hogyha a keringésben lévő PEDF mennyiségét sikerült visszaállítani a normális szintre az a tünetek súlyosságának csökkenésével járna. Egy kísérletben helper-dependens adenovírus vektor segítségével humán SERPINF1 génterméket expresszáltattak Serpinf1 -/- egerek májában, azonban a PEDF overexpressziója nem javított a csont fenotípusán annak ellenére sem, hogy a szérumban helyreállította a biológiailag aktív PEDF szintet [67]. Egy másik kísérletben intraperitoneális injekcióval PEDF tartalmú

mikropartikulumokat juttattak be az egerek szervezetébe, ez növelte a csontok tömegét és részben javította a csontok biomechanikai paramétereit is [68]. Az ellentétes eredményeket esetleg a két módszer hatékonyságának különbsége okozta vagy a PEDF-nek az a képessége, hogy magas koncentrációban már gátolni képes a Wnt jelátvitelt, de ennek tisztázására további kutatások szükségesek.

1.2.5.4. Ifitm5

Az interferon inducible transmembrane protein family 5 gén kifejeződése osteoblasztokban a legerősebb [69]. Az Ifitm5 $-/-$ újszülött egerek görbe csontokkal jönnek a világra, melyek a felnőttkorban korrigálódnak. Jellemző rájuk a függesztőövek megrövidülése, azonban a csonttömegük normális [70]. A humán IFITM5 mutációk többségét a heterozigóta NM_001025295.2:c.-14C>T báziscsere okozza a gén 5' nem-transzlálódó régiójában, ami dominánsan öröklődő V. típusú OI betegségként jelenik meg. Fő jellemzője a hipertróf kallusz kialakulása és a csontok közötti hártályak kalcifikációja [71-72]. Olyan transzgénikus egerekben melyek overexpresszálják a mutáns formáját az Ifitm5-nek, in utero törések és súlyos vázrendszeri malformációk figyelhetők meg. A vad típusú Ifitm5 túltermelése nem jár fenotípusos változással. Érdeemes megjegyezni, hogy egy másik heterozigóta mutáció (NM_001025295.2:c.119C>T), mely a 40. szerin aminosav cseréjét okozza egy leucinra, VI. típusú OI-t jelenít meg a betegben, szignifikánsan csökkent PEDF szérumszinttel. Ebből arra lehet következtetni, hogy a SERPINF1 a PEDF stabilitására van hatással [73-74].

A kollagén bioszintézisét a 3. ábra foglalja össze.



3. ábra: Az I-es típusú kollagén bioszintézise. Az I-es típusú kollagén két $\alpha 1$ - és egy $\alpha 2$ láncból épül fel. A translációt követően a pro- $\alpha 1$ - és pro- $\alpha 2$ láncok a durva felszínű endoplazmatikus retikulumban kerülnek feldolgozásra. A láncoknak megfelelően kell illeszkedniük, hogy a fehérje foldingja során kialakulhasson a tripla-hélix. A tripla-hélix kialakulása közben történnek meg a poszttranszlációs módosítások, az ebben résztvevő génekben bekövetkező mutációk OI-t okoznak. A prokollagén Golgi-készülékbe történő szállítását követően a fehérje exocitózissal az extracelluláris mátrixba jut, ahol megtörténik a C- és N-propeptidek lehasítása és ezzel az I-es típusú kollagén kialakulása. Keresztkötések révén a kollagén molekulák szálatat formálnak [13].

1.2.6. Osteogenesis imperfecta és a TGF- β jelátviteli út kapcsolata

A transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) szignaling modulálja a sejtek osztódását, differenciációját és a sejtvonali elkötelezettségüket, többféle szövetben is [75]. A TGF- β

ligandja inaktív formában szekretálódik. Az aktív TGF- β nem kovalensen asszociál a LAP (latency-associated peptide) propeptiddel, létrehozva a kis látencia komplexet (SLC) [76]. Ez a komplex képes kapcsolódni a látens TGF- β kötő fehérjéhez (LTBP), mely így modulálni tudja a TGF- β megkötését az extracelluláris mátrixban [77]. Az aktivált jelátviteli út elsősorban kináz kaszkádokon át érvényesül. A ligandum kapcsolódását követően a TGF- β receptor heterotetramert formál és indukálja a Smad2/3 foszforilációját, mely ennek hatására a sejtmagba lokalizálódik és génexpressziós változásokat indít be [78].

Csontszövetben az osteoblasztok végzik a TGF- β szekrécióját és a csont mátrixában tárolódik, elsődlegesen az SLC-vel asszociálva [79].

A TGF- β aktivitását modulálják a kis, leucin-gazdag proteoglikánok (SLPR) is, mint például a decorin, mely az aktív TGF- β -hoz és a kollagén fonalakhoz képes kötődni [80-81]. A TGF- β molekula felszabadulhat a csont mátrixából és aktiválódhat a csont osteoklasztok általi reszorpciója során is, melynek további következménye egyben az osteoblaszt prekursor sejtek lokális proliferációjának stimulációján keresztül az új csontszövet kialakulása is. Ezáltal a TGF- β fontos a csont tömegének fenntartásában [82-83]. Mindazonáltal a TGF- β folyamatos aktivációja gátolja az osteoblasztok végső differenciációját, ami alacsonyabb csonttömeghez vezet, a csontsejtek számának növekedése mellett [84-85]. Érdekes módon a *Crtap* $-/-$ egerek fenotípusa megfeleltethető a megnövekedett TGF- β szignaling genetikai modelljének, beleértve az osteoblasztok és osteoklasztok számának növekedését, az osteoblasztok működésének sérülését, alacsony csonttömeget és megnövekedett csontsejt sűrűséget [86-87]. Továbbá az ilyen genotípusú egerek a kórosan túlműködő TGF- β szignaling miatt kialakuló Marfan-szindrómához hasonló tüdő eltéréseket mutatnak [88-89]. A TGF- β neutralizáló antitest kezelés hatására csökkent az osteoblasztok- és klasztok száma, normalizálódott a csontsejtek sűrűsége, továbbá a csont biomechanikai erőssége megközelítette a vad típusúét a *Crtap* $-/-$ egerekben, ráadásul a tüdő paraméterei is javultak a kezelés hatására [86]. Összességében ezek az eredmények azt jelzik, hogy a megnövekedett TGF- β jelátviteli út aktivitás egy általános mechanizmusa lehet a vázrendszeren belüli és azon kívüli osteogenesis imperfectás, domináns és recesszív fenotípusoknak is. Azt azonban még nem ismerjük pontosan, hogy mik azok a folyamatok, amik abnormális TGF- β szignalingot okozhatnak OI-s betegekben.

In vitro kísérletek alapján a decorin kevésbé képes az egyes típusú kollagénhez kötődni. Crtap null egerekben, ami felveti annak lehetőségét, hogy az abnormális kollagén megakadályozza a decorin -és potenciálisan más SLRP molekuláknak is a TGF- β moduláló hatását [86]. A TGF- β szignaling megváltozását tapasztalták Col1a1 +/- egerekben is, változatos súlyosságú fenotípusokkal társultan. A letális formák csontszövetében emelkedett TGF- β expressziót detektáltak, de a Smad2/3 foszforilációjában nem volt változás. A kevésbé súlyos fenotípust mutató egerek csontjában nem változott meg a TGF- β kifejeződés szintje, viszont a Smad2/3 aktivációja fokozott volt [90]. A letalitást mutató kísérleti állatokban a citoszkeleton struktúrájának és funkciójának megváltozását is leírták, mely hatással volt az integrin-mediált jelátvitelre is. Az integrin képes aktiválni a TGF- β -t az extracelluláris mátrixban, így elképzelhető, hogy a megváltozott TGF- β szignaling szerepet játszhat az OI kialakulásában is [90-91]. A jövőben azonban további klinikai vizsgálatokra van szükség annak megállapítására, hogy az osteogenesis imperfectában megváltozott jelátviteli útvonalak célzott befolyásolása biztonságos-e és milyen terápiás haszna lehetséges. Hasonlóan fontos, de jelenleg még tisztázatlan, hogy a különböző proteoglikánok és a kollagén közti kölcsönhatásokban bekövetkező változásoknak milyen szerepük van a betegség patomechanizmusában.

1.2.7. Az osteogenesis imperfecta klinikai megjelenése

A betegség klinikai spektruma meglehetősen széles: a súlyos, perinatálisan letálistól az enyhe, csak későbbi életkorban diagnosztizálható fenotípusig terjed. Fő jellemzője a csontok törékenysége a vázrendszer deformitásával és növekedésbeli elmaradásával, de más tünetek is megjelenhetnek. A súlyos esetek már halva születés formájában is előfordulhatnak, vagy a születést követően nem sokkal, többszörös csonttörések következhetnek be [92]. Az enyhe fenotípussal járó megbetegedésben a törések száma tendenciózusan csökkenhet az életkor előrehaladtával, azonban szülés- és menopauza után ismét megemelkedhet ez a szám. Az OI-s betegek csontsűrűsége (BMD) jellemzően alacsonyabb a normálnál és a csontok mérete is kisebb [93]. A csontok hipermineralizáltak tűnnek, kisebb, de nagyobb számú kristályt tartalmazhatnak. Ez az oka a csontok alacsonyabb mechanikai erősségének [94].

A vázrendszer deformitásai között előfordulhat a hosszú csontok elhajlása, kyphoscoliosis, a csontok acetabuláris részének kiemelkedése és a mellkas torzulása, mint a tölcser- (pectus excavatum) és tyúkmell (pectus carinatum), valamint a hordó mellkas [31]. Az OI minden típusában gyakoriak a csigolyák törése, mely súlyosabb esetekben a csigolyatestek kilapulását okozhatja [95]. A bordák törése általánosan előfordul a súlyosabb esetekben, a hosszú csontok törése szintén valamennyi OI-s betegre jellemző, leggyakrabban a tibia vagy fibula érintettségével.

A szürke vagy kék sclera megléte, illetve árnyalata nem egységes, még egy rokoni körön belül sem. Az idő múlásával az is előfordulhat, hogy a sclera kéksége kivilágosodik. Az egyéb tünetek súlyossága és a sclera fenotípusa között nincs összefüggés [96].

A fogak általánosan érintettek lehetnek, a dentinogenesis imperfecta azonban önálló genetikai betegség, mely az OI nélkül is megjelenhet. A fogak elszíneződhetnek, átlátszóvá válhatnak és idő előtt elkophatnak. A fogak gyökere jellemzően rövid és szűkített, az íny szinte teljesen megsemmisül. A fenotípus akár egy betegben is különböző lehet: keveredhetnek az egészséges megjelenésű és a súlyosan érintett fogak is [97]. Az OI-s betegek több, mint 80%-a dentinproblémákkal is érintett [98].

A hallás sérülése is gyakran előfordul, a betegek 39-57.9%-a érintett [99], a prevalencia növekszik az életkor előrehaladtával. A tünetek akár egy családon belül is variábilisek lehetnek, a hallást érintő tünetek nem mutatnak korrelációt más szervek érintettségével. [44] Az ízületek hipermobilitása szintén általános kísérője az OI-nak, a betegek 66-70%-a mutatja ezeket a tüneteket [100-101], mely az OI minden típusában megjelenhet, függetlenül a fenotípus súlyosságától [101].

A kardiovaszkuláris megbetegedések nagyobb számban fordulnak elő a betegek körében, jellemzően a szívbillentyűk érintettsége figyelhető meg, de kialakulhat pitvarfibrilláció és szívelégtelenség is [102].

1.2.8. Az osteogenesis imperfecta típusainak osztályozása

Az első klasszifikációt Sillence alkotta meg, 1979-ben, mely a klinikai tüneteken és az öröklődés menetén alapult. Négy kategóriát alkotott meg [103]:

- I. típus: nem jár deformitásokkal, autoszómális domináns öröklődésmenet, enyhe vázrendszeri tünetek és kék sclera jellemzi

- II. típus: a legsúlyosabb forma, perinatális letalitással jár együtt, öröklődésmenete autoszómális domináns
- III. típus: súlyos tünetekkel és deformitással járó típus, öröklődése autoszómális recesszív
- IV. típus: tünetei közepes súlyosságúak, a sclera normális árnyalatú. Autoszómális domináns módon öröklődik.

Az új szekvenálási technológia segítségével a genetikai kutatásokban és a diagnosztikában végbemenő változások miatt az osztályozási rendszer átalakult és a genetikai defektust vette a típusba sorolás alapjának. Ez azonban bizonytalanná tenné a klasszifikációt és nem lenne lehetséges egy specifikus génhibát korreláltatni a klinikai tünetekkel és azok súlyosságával, a geno- és fenotípusok jelentősen átfedő természete miatt. Emiatt 2015-ben, a genetikai okokra visszavezethető vázrendszer betegségek klasszifikációjának aktualizálása során, a szerzők az eredeti, Sillence-féle beosztás megtartását javasolták. Elismerik az osteogenesis imperfecta genetikai komplexitását, és ugyanannak a mutációnak a fenotípusos varianciáját, éppen ezért tartják szükségesnek, hogy az osztályozás közvetlenül ne támaszkodjon semmilyen molekuláris genetikai jellemzőre sem. Az OI 1-4 típusai megfeleltethetők az eredeti I-IV típusnak, az ötös típust pedig a sajátos radiológiai tulajdonságai miatt hozták létre [104]. Az 1. táblázat foglalja össze a jelenleg javasolt, elsősorban klinikai jellemzőkön alapuló osztályozást.

1. táblázat: Az osteogenesis imperfecta klinikai megjelenésén alapuló osztályozási rendszer. Látható, hogy egy gén többféle fenotípus kialakításában is szerepet játszhat, így a genotípus felől közelítve a típusba sorolás nem minden esetben lehetséges. (ÖM: öröklődésmenet)

Betegség neve	Típusa	ÖM	Gén	Fehérje
Nem-deformáló forma	Type 1	AD	COL1A1	a1 chain of type 1 collagen
			COL1A2	a2 chain of type 1 collagen
Perinatálisan letális forma	Type 2	AD, AR	COL1A1	a1 chain of type 1 collagen
			COL1A2	a2 chain of type 1 collagen
			CRTAP	Cartilage-associated protein
			LEPRE1	Prolyl 3-hydroxylase 1
			PPIB	Cyclophilin B
Progrediáló, deformáló forma	Type 3	AD, AR	COL1A1	a1 chain of type 1 collagen
			COL1A2	a2 chain of type 1 collagen
			CRTAP	Cartilage-associated protein
			LEPRE1	Prolyl 3-hydroxylase 1
			PPIB	Cyclophilin B
			SERPINH1	Heat-shock protein 47
			BMP1	Bone morphogenetic protein 1
			FKBP10	Peptidyl prolyl isomerase FKBP65
			PLOD2	Lysyl hydroxylase 2
			SERPINF1	Pigment epithelium-derived factor
			SP7	Osterix
			WNT1	Wingless family member 1
			TMEM38B	Trimeric intracellular cation channel subtype B
			CREB3L1	cAMP response element-binding protein 3-like 1
			SEC24D	Protein-component of the COPII complex
Enyhe forma	Type 4	AD, AR	COL1A1	a1 chain of type 1 collagen
			COL1A2	a2 chain of type 1 collagen
			CRTAP	Cartilage-associated protein
			PPIB	Cyclophilin B
			FKBP10	Peptidyl prolyl isomerase FKBP65
			SERPINF1	Pigment epithelium-derived factor
			WNT1	Wingless family member 1
Hipertróf kallusz kialakulása és a csontok közötti hártyák kalcifikációja jellemzi	Type 5	AD	IFITM5	Bone-restricted ifitm-like protein

1.2.9. Az osteogenesis imperfecta kezelésének lehetőségei

A OI betegek kezelésének általános célja a törések incidenciájának csökkentése, a csontfájdalom mérséklése, illetve mozgás fejlesztése. Figyelemmel kell kísérni a vázrendszeren kívüli tünetek és a kezelések mellékhatásainak kialakulását.

Kalcium és D-vitamin

Habár a metabolikus csontbetegségek esetében a megfelelő kalcium és D-vitamin bevitelt tartják a legfontosabbnak, OI betegek bevonásával még nem történtek olyan klinikai vizsgálatok, mely az optimális dózis, illetve szérum szintek megállapítását célozta volna. A rendelkezésre álló adatok szerint a 25(OH)D-vitamin szintje pozitív asszociációt mutat az érintettek BMD értékeivel [105]. Egy közelmúltból származó, randomizált klinikai kísérlet során, gyermek és fiatal felnőtt OI-s páciensek kaptak napi kétszeri D3 vitamint, két dózisban (400 IU és 2000 IU), egy évig, mely során a BMD z-score értékek meghatározása jelentette a végpontot [106]. Az eredmények szerint a több egységnyi D-vitaminnal kezelt csoportban magasabb volt a 25(OH)D-vitamin szintje, a BMD tekintetében nem volt szignifikáns különbség a két csoport között. Az alsó csoportok vizsgálata azonban kimutatta, hogy a 20 ng/ml 25(OH)D-vitamin szint alatt a nagyobb dózisú D-vitamin kezelés kismértékben jobb BMD választ váltott ki. Az ajánlások szerint 1300mg kalcium és 600-800 IU napi D-vitamin bevitel a legtöbb esetben elégséges lehet. A betegek közötti variancia, a D-vitamin pótlás biztonságossága (2000 IU vagy afölött is) és a kevés rendelkezésre álló adat miatt észszerűnek tűnik a 30 ng/ml 25(OH)D-vitamin szint elérése, nagyobb dózisú készítmény adásával.

Csont specifikus gyógyszerek

Habár az OI betegek kezelésének indikációja függ a klinikai fenotípustól, az enyhe megjelenésű formáknál valószínűsíthető a biszfoszfonát kezelés jótékony hatása. Általánosságban, gyermekekben a csigolyák törése (függetlenül a BMD z-score értéktől) vagy legalább 2-3 minimális trauma hatására bekövetkező törés a hosszú csontokban (10-18 éves kor között, BMD z-score < -2) jó indikációja a kezelésnek.

Posztmenopauzális nőbetegekben, illetve 50 év feletti férfiaknál szintén javasolható a terápiás beavatkozás, ha a BMD T-score $< -2,5$ [107].

Biszfoszfonát (BP) kezelés

A biszfoszfonát kezelés a legszélesebb körben alkalmazott gyógyszer a menopauza utáni-, férfi- és glükokortikoidok-által indukált csontritkulás esetén. A BP a hidroxipatitához kötődik hozzá és az osteoklasztokra gyakorol hatást. A kezelés csökkenti a csont remodellinget, növeli a mineralizációt és a BMD értékét. Több randomizált klinikai vizsgálat is igazolta a csont törékenységet csökkentő hatását az alendronsav, rizedronsav és a zoledronsav hatóanyagok. Az orálisan alkalmazott biszfoszfonátok biohosszúsága roppant alacsony, a bevitt dózisnak körülbelül csak 1%-a szívódik fel a bélrendszerben. Mivel a BP beépül a csontokba is, így a félélet-ideje tíz év is lehet [108].

A biszfoszfonátokat elterjedten használják a gyermekkori OI kezelésére, szájon át (alendronsav, rizedronsav) és intravénásan (pamidronsav, neridronsav, zoledronsav) is adva. A kezelés jellemzően általánosan javítja a csontok BMD értékét, különösen a csigolyákét. Azonban az olyan, placebo kontrollált klinikai vizsgálatok eredményei, melyek a törékenységre, mobilitásra és a csont fájdalom csökkenésére gyűjtöttek volna adatokat, még hiányoznak. Valószínűleg nem is fog sor kerülni ilyen tesztekre, mert a nemrég megjelent összefoglaló közlemények nem találtak biztos javulást az osteogenesis imperfectás betegek klinikai státuszában, a kezeléseket követően [109]. A kezelés elkezdésének és folytatásának a csigolyák- vagy a hosszú csontok törésének megléte képezheti az alapját. A leggyakrabban használt intravénás zoledronsav dózisát, illetve az infúzió beadásának gyakoriságát, valamint a kezelés hatékonyságát a klinikai válasz és a BMD z-score értékének segítségével határozzák meg. Általában a zoledronsav készítményt $0,1 \text{ mg / kg}$ mennyiségben alkalmazzák, évi két infúzióra elosztva (nem számítva a legelső dózist, mely biztonsági okokból $0,0125 \text{ mg/kg}$). Ha a beteg még növésben van és nem érte el a z-score $> -2,0$ értéket, akkor a terápia ugyanilyen adagokban fenntartható. Ha a beteg elérte a z-score $> -2,0$ -t, akkor a dózist csökkenteni kell a növekedés befejeztéig. Ha a z-score $> 0,0$ és a páciens még mindig növésben van, akkor az infúziót évente kell adni [110]. A kezelés fenntartása azért szükséges a növekedés befejezéséig, mert a gyógyszer megvonása a korábban kezelt területekben

BMD csökkenést okozhat a metaphysis területén, mely a magasabb BMD-t mutató részek mentén szöveti stresszt és ezáltal magasabb törési kockázatot okozhat (4. ábra) [111].



4. ábra: Többszörös zebra csíkok egy 14 éves, egyes típusú osteogenesis imperfectában szenvedő nőbetegéről készült felvételen. A beteg zoledronsav infúziót kapott fél évente, 5 éven át, majd a terápia megszakadt. A zebra csíkok a ciklikus kezelések eredményei, melyek az epiphysis záródása előtt jöttek létre. Minden sclerotikus csík egy infúziós ciklusnak felel meg [107].

A legtöbb tanulmány szerint a scoliosis progresszióját csökkenteni tudja a biszfoszfonát kezelés a súlyos esetekben, de a scoliosis előfordulása a felnőtt betegekben függetlennek mutatkozott a BP kezeléstől, vagy a kezelés elkezdésének idejétől I-es és IV-es típusú OI-s betegeket vizsgálva [112]. A nem-csigolya törések esetében a legtöbb tanulmány kedvező, de nem szignifikáns hatásokról számol be, mely összhangban van a BP terápia mérsékelt eredményességével a törési kockázat csökkentését tekintve és kiemeli a tény, mely szerint a jelenlegi terápia nem képesek korigálni a csontok geometriáját és a kialakult deformitásokat.

A biszfoszfonát kezelés mellékhatásai

Egy retrospektív vizsgálat szerint a legtöbbször előforduló mellékhatás a hipofoszfátémia volt (25,2%), ezt követte az akut fázis reakció (19,1%) és a hipokalcémia (16,4%) [113]. Az akut fázis reakció gyakori rövid távú mellékhatása a BP készítményeknek, mely során jelentkezhet láz, hát- és csontfájdalom, hányinger és hasmenés is. A tünetek jellemzően az első beadást követő 24 órában jelentkezhetnek és jellemzően későbbi kezeléseknél már nem lépnek fel újra [110]. Kialakulhat hipokalcémia az intravénás biszfoszfonátot követően, ez azonban elkerülhető, ha az infúzió után egy hétig kálciumpótlásról gondoskodunk, illetve ha a beadás csak megfelelő 25(OH)D-vitamin szint mellett történik meg. A veseelégtelenség egyértelmű kontraindikációja a BP alkalmazásának (GFR <35ml/min), kiemelt figyelmet kell fordítani a vesefunkciók ellenőrzésére, ha az adott esetben a szérum kreatinin nem megbízható marker (pl.: alacsony izomtömeg). Álkapocsnekrózist nagyobb betegszám (n=439) esetében sem figyeltek meg [114]. A legriasztóbb lehetséges mellékhatása a hosszú távú biszfoszfonát kezelésnek az atipikus combcsont törések. Az elmúlt években több publikáció is bemutatott olyan felnőtt és gyermek korú OI betegeket, akiknél jelentkezett ez a káros hatása is a terápiának [115]. Egy közelmúltbeli, részletes, retrospektív vizsgálat 127 combcsont törést analizált 24 gyermekben (11 I-es típus, hat II-es típus és hét IV-es típus) és nem talált összefüggést se magával a BP kezeléssel, se a kumulatív dózissal [116]. Az atipikus femorális törés patomechanizmusa és a biszfoszfonátokkal való kapcsolata még tisztázatlan és vitatott is az irodalomban.

Denosumab kezelés

A denosumab egy monoklonális antitest, mely a RANKL molekulát célozza. Alkalmazási területe elsősorban a posztmenopauzális- illetve férfi osteoporosis. Néhány kutatás a denosumab hatását vizsgálata olyan OI betegeknél (I/IV típusból 8 beteg, III-as típusból 2 beteg), akiknek az állapotát a SERPINF1 gén mutációja okozta és a korábbi gyógyszeres kezelésre nem reagáltak jól [117-118]. 3 hónapnyi terápiát követően szignifikáns BMD növekedést mutattak ki minden esetben, komolyabb mellékhatások nélkül. A betegek mindegyike kapott a denosumab terápia előtt biszfoszfonát kezelést is, biszfoszfonát naív betegeknél különös odafigyelést igényel

a csigolyatörések megelőzése, mely a denosumab felfüggesztésének ritka komplikációja lehet.

Anabolikus terápia

Jelenleg Európában a teriparatid az egyetlen engedélyezett hatóanyag menopauzális- és glükokortikodok-által indukált csontritkulás elleni anabolikus terápia céljából. Az USA területén 2017-ben az FDA által engedélyezésre került az abaloparatid hatóanyag tartalmú gyógyszer is. A teriparatide növeli a csont remodellinget, a csontképzést a reszorpcióval szemben, továbbá csökkenti a vertebrális- és a nem-vertebrális törések kockázatát is. A kezelés kontraindikációja a még nem záródott epiphysis régiók megléte. A közelmúltban egy randomizált, placebo kontrollált klinikai vizsgálatban 78 felnőtt OI beteget kezeltek teriparatidevel, mely során az I-es típusú OI esetén szignifikáns BMD növekedést észleltek. A súlyosabb III/IV-es típusú megbetegedésekben azonban nem mutattak ki előnyt a placebohoz képest [119].

A sclerostin gátlása egy másik lehetőség lehet az osteogenesis imperfectára jellemző csonttörékenység kezelésére. Romosozumab (ez szintén egy monoklonális antitest, mely a sclerostint köti) egy éven át történő adása csökkentette az osteoporotikus törések incidenciáját, csontritkulásban szenvedő nőbetegekben [120]. Egérmodellekben biztató eredmények születtek az enyhébb formájú OI kezelésére is. Egy randomizált, fázis 2A vizsgálat során neutralizáló, IgG2 λ monoklonális, anti-sclerostin antitesttel (BPS804) kezeltek 14 felnőtt beteget. A vizsgálat során a csontképzés növekedését, a reszorpció csökkenését tapasztalták [121]. A romosozumab hatóanyagú készítményt 2019-ben engedélyezte az FDA osteoporosis kezelésére.

Egyéb lehetséges terápiák

A TGF- β jelátviteli út zavarai osteogenesis imperfecta kialakulásához vezethetnek, míg az ilyen esetekben a jelút gátlása növelheti a csont tömegét és erősségét. Jelenleg fázis 1 vizsgálat zajlik egy nagy affinitású TGF- β neutralizáló antitest (fresolimumab) hatását vizsgálva felnőtt közepes-súlyos OI betegekben [122].

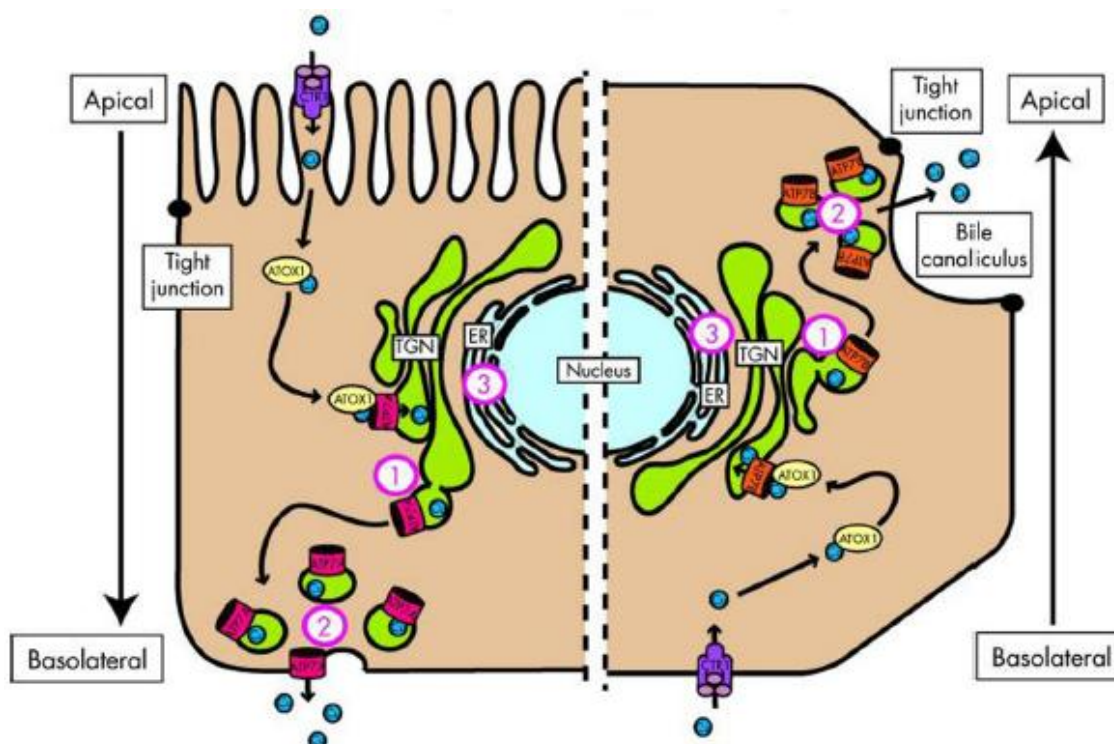
Posztmenopauzális nőkben a csont törékenység javulásáról számoltak be teriparatid és zoledronsav vagy denosumab kombinációját követően [123].

Más beavatkozási lehetőségek, mint a csontvelő transzplantáció vagy a génterápia, még kutatás alatt állnak, súlyos formájú OI kezelésére.

1.3. WILSON-KÓR BEVEZETÉS

A Wilson-kór genetikai diagnosztikájának eredménye közvetlen klinikai következménnyel járhat, ezért különösen fontos, hogy az alkalmazott módszer gyorsan szolgáltasson, nagy megbízhatóságú eredményt. A molekuláris vizsgálat sebessége abból a szempontból is életmentő lehet, hogy biztosan pozitív diagnózis birtokában, akut esetben a beteg előrekerül a nemzetközi májtranszplantációs listán. A betegséghez kapcsolt gén két tucatnyinál több kódoló exont tartalmaz, melyek bármelyikében előfordulhat káros hatású mutáció, így alkalmas az új-generációs szekvenálás képességeinek bemutatására.

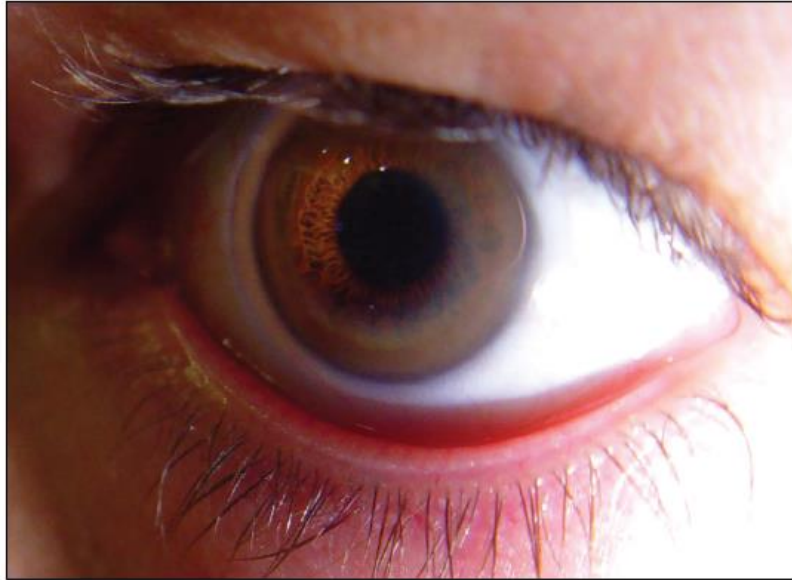
Sir Samuel Alexander Kinnier Wilson, az Egyesült Államokban született, de Angliában tanult neurológus volt az első, aki összekapcsolta a neurológiai degenerációval járó tüneteket a máj cirrhosiával, melyet leginkább boncolások során azonosítottak csak. Több mint egy évszázaddal az áttörő tanulmánya [124] után már pontosan ismert a betegség patomechanizmusa és a mögötte álló genetikai ok is. Az első leírójáról Wilson-kórnak elnevezett anyagcserebetegséget a májsejtekben kifejeződő réz transzporter ATPáz 2-t kódoló, ATP7B génnek a defektusa okozza [125]. Az átlagos napi rézbevitel 1,5-2,5 mg naponta, ami a gyomorban és a patkóbélben szívódik fel, majd pedig a keringésben lévő albuminhoz kötődve a májba szállítódik. A réz felvétele a májsejtek basolaterális oldalán történik meg, a réz transzporter 1 (CTR1) segítségével. Egy specifikus réz chaperon fehérje (antioxidáns fehérje 1, ATOX1) szállítja a felvett réz ionokat a réz transzporter ATPáz 2-höz (ATP7B), rézfüggő fehérje-fehérje kölcsönhatások révén [126]. A citoplazmában az ATP7B funkciói közé tartozik a fölösleges réz vezikulákba csomagolása és excitózissal történő eltávolítása az apikális membránon át, az epébe [127] (5. ábra).



5. ábra: Sematikus ábrázolása a réz-indukált ATP7A és ATP7B relokalizációnak. Az ábra bal oldala egy enterocitát mutat be, míg a jobb oldalon egy májsejt látható. A réz mindkét esetben a réz transzporter 1 (CTR1) fehérje közreműködésével jut be a sejtbe és utána az antioxidáns fehérje 1 (ATOX1) kíséri a transz-Golgiban elhelyezkedő ATP7A vagy ATP7B-hez. Amikor a réz szintje elér egy bizonyos értéket, akkor az ATP7A és az ATP7B kibocsájtja a rezet plazmába basolaterális oldalán az enterocitáknak, illetve a réz az epeutakba kerül a hepatociták apikális oldalán. Az ATP7B lokalizációban bekövetkező defektus következtében réz felhalmozódás keletkezhet a transz Golgi hálózatában (1), a sejt perifériális részében (2) és az endoplazmatikus retikulumban a fehérje folding hibája miatt (3) [128].

Az érintett betegekben a normális réz kiválasztás az epeutakba csökkent működést mutat, a hiányzó vagy nem működő réz transzporter fehérje miatt. Ez a réz felhalmozódását okozza a májsejtekben, mely idővel túllépi a tárolható mennyiséget és a sejtek sérülését fogja okozni. Ezt követően a réz a keringésbe jut és más szervekben halmozódik fel, jellemzően a központi idegrendszer területén, ahol neurológiai- és pszichiátriai megbetegedést okozhat. Jellemző tünete a betegségnek a szaruhártyában megjelenő Kayser-Fleischer gyűrű is (6. ábra). A legtöbb Wilson-kórban szenvedő beteg májtünetei

az első- vagy a második életévtizedben jelentkeznek, míg a neurológiai panaszok jellemzően a betegek huszas-harmincas éveikben lépnek fel [129].



6. ábra: Kayser-Fleischer gyűrű réz lerakódással a szaruhártyán, mely a szaruhártya külső területének barnás elszíneződését okozza [130].

A májsejtek hibásan működő réz homeosztázisára enged következtetni a plazmában mérhető alacsonyabb keringő cöruroplazmin szint. Az ATP7B funkciói közé tartozik a réz transz-Golgi készülékbe való továbbítása. Az cöruroplazmin fehérje itt kapná meg a réz proszitetikus csoportját, mely szükséges a helyes térszerkezet kialakításához. Enélkül az apocöruroplazmin peptid máshogyan tekeredik fel, ami csökkent félélet-időt eredményez a plazmában, vagyis azt tapasztaljuk, hogy a betegnek a normálisnál alacsonyabb a cöruroplazmin szintje. Magának a cöruroplazminnak a hiánya nem vezet a réz felhalmozódásához, az acöruroplazminémiában szenvedő betegek vizsgálata alapján. Ebben a megbetegedésben a májsejtek nem szintetizálnak cöruroplazmin fehérjét, a betegségre jellemző tüneteket pedig a vas háztartása felborulása okozza [131-132].

A mutáció penetranciája 100%-os, azonban az okozott fenotípus igen variábilis. A Wilson-kór incidenciáját általában 1:30 000-re becsülik, egy brit tanulmány szerint azonban ennél gyakoribb is lehet az előfordulása (1:7000) [133]. A Wilson-kór monogénes, autoszómális recesszív módon öröklődő betegség. A kór kialakulásához

compound heterozigótaság fennállása (két különböző mutációra) vagy homozigótaság (egy mutációra) szükséges. A kór hordozói nem mutatnak tüneteket. Az irodalomban ismertettek több olyan családot is, ahol az öröklődésmenet pszeudo-domináns jellegű mutatott, ezért csak az öröklődésmenet alapján nem lehet elvetni a Wilson-kór diagnózisát [134]. Atipikus öröklődés is előfordulhat, ismert olyan beteg, aki három mutációt hordoz, illetve olyan is ahol a betegséget uniparentális diszómia okozta [133]. Jelenleg az ATP7B az egyetlen gén, amit a Wilson-kór hátterében azonosítottak, az összes exonjában írtak le káros mutációkat [135-136]. Több, független klinikai vizsgálat is beszámolt olyan esetekről, ahol a beteget a klinikai kép és a biokémiai paraméterek alapján Wilson-kórral diagnosztizálták, de csak egy heterozigóta mutációt hordozott az ATP7B génben. Ez felveti egy második kóros gén létezését, ezidáig azonban ilyen gén nem került felfedezésre [137].

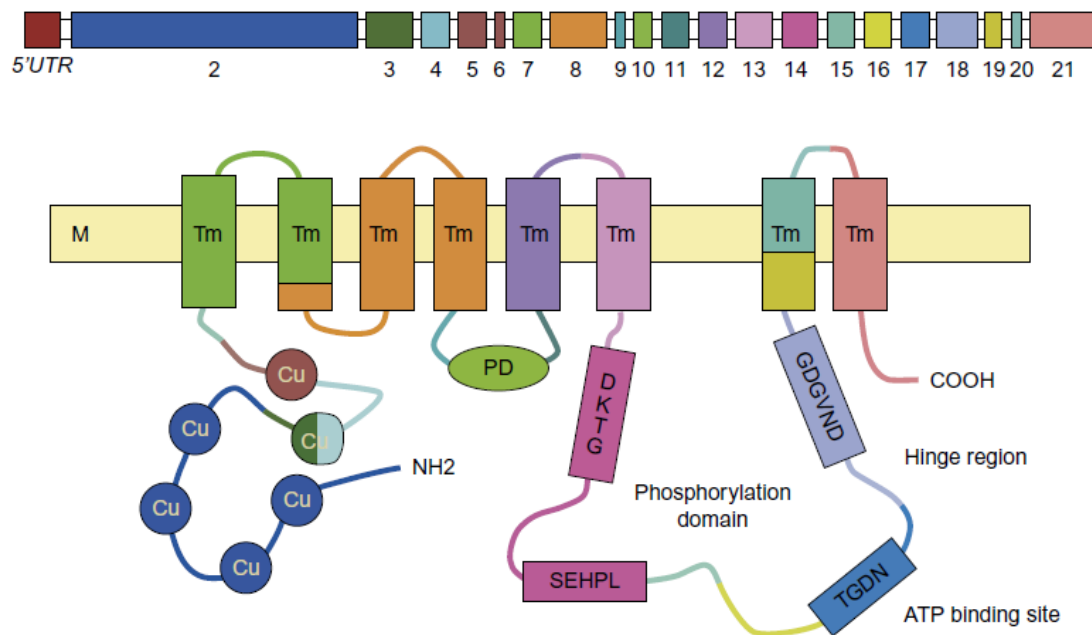
Nagyobb betegpopuláción végzett megfigyelés szerint a prion fehérje (PRNP) egyik polimorfizmusa (NM_000311.4:c.385A>G), mely a 129. kodonban okozza a metionon valin aminosavra való kicserélődését, összefüggést mutat a Wilson-kórhoz köthető neurológiai tünetek súlyosságával. A 129-es kodon polimorfizmusa nem függ össze a prion betegséggel, azonban korrelációt mutat az Alzheimer-kór kialakulásának kockázatával [138] és a hosszútávú memória működésével [139].

Fontos megemlíteni, hogy a Wilson-kórban bekövetkező halálozás fő oka a megkésett diagnózis.

1.3.1. Az ATP7B felépítése és funkciója

Az ATP7B a 13. kromoszóma 13q14.3 régiójában helyezkedik el, 20 intron és 21 exon alkotja, a teljes genomi mérete 80 kb [135]. A gén terméke az endoplazmatikus retikulumban szintetizálódik, utána májsejtekben áthelyeződik a transz-Golgiba. A gén expressziós szintje a májban a legmagasabb, de kifejeződik a vesékben, placentában, tüdőben és az agyban is. Az ATP7B az erősen konzervált P-típusú ATPáz szupercsaládba tartozik, melyek funkciói közé tartozik a nehézfém ionok transzportja a sejtmembránon át [140]. A fehérje 1465 aminosavból áll, tartalmaz egy foszfatáz domént (A-domén), foszforilációs domént (P-domén, 971-1035 aminosavak), nukleotid-kötő domént (N-domén, 1240-1291 aminosavak) és egy M-domént, mely nyolc transzmembrán ion

csatornát foglal magában (7. ábra). Mindegyik domén központi struktúrájára egy unikális aminosav motívum jellemző, mint például TGEA az A-doménben, DKTGT a P-doménben és SEHPL az N-doménben. Az N-terminális fém-kötő domén hat, réz-kötő régiót tartalmaz, melyeket egy konzervált aminosav szekvencia épít fel (GMXCXXC) [141]. Ezek a fém-kötő helyek központi szerepet játszanak a réz átvételében a réz chaperon Atox1-től fehérje-fehérje kölcsönhatások révén. Érdekes módon az 5-6. réz-kötő helyek erősebb hatással vannak az Atp7b fehérje katalitikus aktivitására, mint az 1-4. helyek [142]. A réz aktív transzportja a sejtmembránon át egy komplex folyamat, aminek az első lépésenként az Atp7b megköti a rezet az N-terminális doménja segítségével és ATP felhasználásával átjuttatja azt a membránon. Ezt követően a szabad réz az intracelluláris fém-kötő domének GG motívumaihoz kapcsolódik, majd a fém-kötő hely domén 6 (MBD6) cisztein-prolin-cisztein (CPC) szekvencia motívumaihoz adódik át. Végül az A-domén acil-foszfát részének defoszforilációja következik be, mely átbocsájtja a rezet a sejtmembránon. A folyamat bármely lépését befolyásoló káros mutáció a réz felhalmozódását okozhatja [143]. A hisztidin tartalmú SEHPL domén befolyásolja a réz transzportját, azonban ennek pontos mechanizmusa még nem ismert. Az Európában leggyakoribb mutáció az 1069-edik hisztidin kicserélődését okozza glutaminre, a homozigóta eltérést hordozó májsejtekben az Atp7b fehérje az endoplazmatikus retikulumban helyezkedik el, a transz-Golgi helyett, mely a fehérje abnormális szállítását jelentheti [144].



7. ábra: Sematikus ábrázolása a humán ATP7B génnek és fehérjének. A felső diagram mutatja az 5' nem-transzlálódó régiót (UTR) és a promotert és az intronok által elválasztott exonokat. Az alsó ábra mutatja be a domén szerkezetét a réz ATPáznak. A konzervált aminosav szekvenciák feltüntetésre kerültek a funkcionális domének központi struktúrájában: TGDN és GDGVND az A-doménben, DKTG a P-doménben és SEHPL az N-doménben. M: kétrétegű foszfolipid sejtmembránt, Cu: fémkötő régiói a transzmembrán kation csatornának, Tm: transzmembrán domének, PD: foszfatáz domén [145].

1.3.2. Az ATP7B gén mutációi

Több, mint 600 patogén mutáció található a Human Gene Mutation Database (HGMD) adatbázisában az ATP7B génről [146]. A leggyakoribbak a misszensz és nonszensz pontmutációk, ezeket követik a kisméretű inzerciók-deléciók és a splicingot befolyásoló nukleotidcserék. Előfordulhatnak más, ritka genetikai mechanizmusok is, mint teljes exon deléciók, promoter mutációk, három patogén eltérés együttes megléte és monogénes diszómia is [130,133]. A mutációs „hotspot” földrajzi régióként változik, a kaukázusi populációban a p.H1069Q a leggyakoribb (30-70%) patogén eltérés. A további patogén mutációk többsége az M- és N-doménekben található, preszimptomás- vagy hepatikus

szimptomákat mutató páciensekben [147-148]. A p.H1069Q az N-domén konzervált SEHPL régiójában található hisztidin cseréjét okozza glutaminra, amely az N-domén hibás foldingját, a P-domén abnormalis foszforilációját és csökkent ATP-kötő képességet okoz [149]. A mutáció a fehérje csökkent hőstabilitásáért és abnormalis lokalizációjáért is felelős. A SEHPL motívum más mutációi, mint például a p.E1064A nem jár együtt a hibás térszerkezet kialakulásával, azonban az ATP-kötő képessége teljesen megszűnik a fehérjének. Az p.R778L misszensz változás a réz transzmembrán transzportját befolyásolja [150], a p.G943S és a p.M769V aminosav cserék pedig a réz metabolizmus defektusát okozzák, normális cöroloplazmin szint mellett [151]. A Wilson-kórral összefüggést mutató mutációk jelentős részében megfigyelhető a mutáns fehérje alacsony szintje, mely a megnövekedett fehérje degradációval függ össze [128]. A nonszensze és frameshift mutációk valószínűleg az mRNS lebomlását okozzák [152] vagy egy jelentősen trunkált fehérje létrejöttét, ami jelentéktelen fehérjeszintet fog eredményezni a sejtekben. A legtöbb beteg compound heterozigóta, különböző mutációkat hordozva a két kromoszómán.

1.3.3. Genotípus-fenotípus összefüggések

Közvetlen genotípus-fenotípus korrelációkat igen nehéz a Wilson-kór esetében megállapítani, annak ellenére, hogy sok tanulmány foglalkozott a kérdéssel [153]. A nagyszámú, de alacsony előfordulású mutáció, illetve a legjellemzőbb compound heterozigóta előfordulás miatt a genetikai variációk klinikai karakterizálása roppant nehéz. A fenotípusok leírása általában csak a tünetek megjelenésének idejére és magukra a tünetekre vonatkoznak, azonban a diagnózis bizonytalansága vagy késlekedése, illetve a klinikus gyakorlottsága jelentős befolyással van ezekre. Emiatt a Wilson-kór nagyfokú fenotípusos variabilitásáért inkább a genetikai-, metabolikus- és környezeti faktorok együttes hatása lehet a felelős [154]. A legkonzisztensebb genotípus-fenotípus korrelációt a legsúlyosabb, korai életkorban megjelenő és elsősorban máj tünetekkel járó Wilson-kórral összefüggésben sikerült megállapítani: ezért a klinikai képért olyan mutációk felelősek, melyek teljesen megszüntetik az Atp7b fehérje ATPáz aktivitását. Az ATP7B gén genetikai polimorfizmusai, más gének, illetve epigenetikus faktorok is befolyásolhatják a fenotípust [143]. A misszensz mutációk többsége az ATP7B réz

transzport funkcióját inaktiválja. Általánosságban a trunkált fehérje keletkezését okozó nonszensz mutációt hordozó betegekben korábban jelentkeznek a tünetek a csökkent fehérje mennyiség és stabilitás miatt [155]. Más tanulmányokban az enyhébb fenotípusos formát a részlegesen megmaradt réz-szállító képességgel hozták összefüggésbe [150]. A p.R778L mutációt hordozó betegeknel általában korán jelentkeznek a tünetek, melyek elsősorban a májat érintik [156]. Ezzel szemben a p.H1069Q mutáció esetében a tünetek jellemzően 20-22 éves korban jelentkeznek, elsősorban a központi idegrendszer érintettségével [157]. Arról is vannak adatok, hogy a Kayser-Fleischer gyűrű gyakrabban fordul elő a magyar betegek között a p.H1069Q homozigóta mutáció megléte esetén, mint compound heterozigóta genotípus esetében [158]. A p.Met875Val mutáció eredménye egy kevésbé stabil fehérje, mely az Atp7b fehérje lokalizációjának reverzibilis defektusát okozza. Alacsony réz tartalmú közegben a p.Gly875Arg variánssal terhelt fehérje az endoplazmatikus retikulumba kerül. Azonban, ha kívülről rezet viszünk be a sejtek táplódatába, akkor a fehérje stabilizálódik és áthelyeződik a transz-Golgiba, ami a betegségre jellemző fenotípus megszűnését okozza. Teoretikusan, az ilyen mutációt hordozó betegek érzékenyebbek lehetnek a táplálék réztartalmára [159]. Knock-out egérmodellen végzett vizsgálatok alapján a rézfelhalmozódás időben és térben változó a sejteken belül, így ennek a vizsgálata pontosabb prognosztikus marker lehet, mint a teljes réz szint vizsgálata [160]. Egy sok tagú libanoni család vizsgálata során lehetőség nyílt a homozigóta és a compound heterozigóta genotípusokhoz társult fenotípusok vizsgálatára is, eszerint a c.2299insC mutáció a máj érintettségével társul, míg a p.Ala1003Thr mutáció pedig a neurológiai tünetekkel [147].

További olyan gének, melyek polimorfizmusainál, felmerült annak a lehetősége, hogy befolyásolják a Wilson-kór fenotípusát: MTHFR [161], COMMD1 [162], ATOX1 [163], XIAP [164] és DMT1 [165]. A vizsgálatok egyik gén esetében sem igazolták, hogy jelentős diagnosztikus vagy prediktív értékük lenne.

Szignifikáns fenotípusos különbségeket lehet megfigyelni olyan Wilson-kóros betegek közt, akiknek megegyezik az ATP7B genotípusok, illetve egy családon belül is lehetnek ilyen különbségek, sőt egypetéjű ikrek között is [166].

Egyes tanulmányok nagymértékű egyezést írtak le a biokémiai és a klinikai paraméterek közt, családon belül, mások pedig ezzel ellentétes megfigyeléseket tettek és széleskörben eltérő megjelenését tapasztalták a Wilson-kórnak, ugyanazon családon belül is. Ezek az

adatok, illetve az egypetűjű ikrekben észlelt fenotípusos eltérések felvetik az epigenetikus faktorok jelentőségét, ezekről azonban ma még keveset tudunk.

1.3.4. Klinikai diagnosztikai megközelítések

Talán a legáltalánosabb eset, amikor számításba kell venni a Wilson-kór lehetőségét, ha egy beteg megmagyarázatlan májbetegséggel és abnormális májfunkció teszt eredményekkel érkezik. A kórtörténet segíthet kizárni az alkoholfogyasztást és a gyógyszerek által okozott májkárosodást, azonban egyes szerológiai markerek átfedhetnek egymással vírusos hepatitis, autoimmun májbetegség vagy májgyulladás esetében is. Amennyiben a páciens családjában már előfordult korai neurológiai, pszichiátriai megbetegedés, vagy más, ismeretlen eredetű májbetegség, akkor indokolt lehet a Wilson-kór diagnosztizálásának irányába elindulni. A neurológiai tünetek leggyakrabban tremorral jelentkeznek, majd a progresszió során egyensúlyzavarok, dysarthria és nyáladás jelentkezhet. Kései stádiumban a tünetek a Parkinson-kórra emlékeztetnek. A pszichiátriai tünetek széles skálája előfordulhat, az enyhe hangulatingadozástól a pszichózisig, de a leggyakrabban a depresszió néhány eleme jelenhet meg [167]. Egy tanulmány szerint a Wilson-kórban szenvedő betegek 20%-a állt pszichiátriai gondozás alatt, a tényleges és helyes diagnózis előtt. Az átlagos idő, ami eltelik a pszichiátriai tünetek jelentkezése és a Wilson-kór diagnózis között: 864 nap [168].

A klinikai döntéshozás egységesítésének és segítésének céljából létrehoztak egy súlyozott, diagnosztikai pontrendszert, mely egyaránt tartalmaz klinikai, biokémiai és molekuláris genetikai vizsgálatokat is [169]. Amennyiben a vizsgált beteg 4 vagy több pontot kap eszerint a szisztéma szerint, akkor a Wilson-kór diagnózisa nagyon valószínű [170] (2. táblázat). Ennek a kritériumrendszernek a hiányossága, hogy az elvégezhető tesztek sorrendjére nem tesz javaslatot, az a klinikus döntése maradt. Javasolható, hogy elsősorban nem-invazív beavatkozásokra kerüljön sor, szemészeti-, vér- és vizeletvizsgálatok, illetve molekuláris genetikai tesztek ajánlhatóak. Májbiopsziára inkább csak akkor kerüljön sor, amikor más megközelítések nem hoztak diagnosztikus eredményt.

2. táblázat: A Wilson-kór diagnosztizálására szolgáló pontrendszer. 4 pont esetén a diagnózis nagyon valószínű, 3 pontnál a diagnózis lehetséges, de további tesztek szükségesek, 2 vagy kevesebb pontnál a diagnózis valószínűtlen. ULN: a normál érték felső határa *: tipikus eltérések agyi MR felvételen †: ha a kvantitatív máj réz érték nem érhető el

Kayser-Fleischer gyűrű	Pontszám
Jelen van	2
Nincs jelen	0
Neurológiai tünetek*	
Súlyos	2
Közepes	1
Enyhe	0
Szérum cöruoplazmin	
Normál (>200mg/l)	0
100-200 mg/l	1
<100 mg/l	2
Haemolítikus anémia	
Jelen van	1
Nincs jelen	0
Máj réztartalma	
> 5x ULN (>250 µg/g)	2
20-250 µg/g	1
Normál (<50 µg/g)	-1
Rhodanin pozitív részek †	1
Vizelet réz tartalma	
Normál	0
1-2x ULN	1
> 2x ULN	2
Normál, de > 5x ULN penicillamin kezelés után	2
Mutáció vizsgálat	
Homozigóta	4
Heterozigóta	1
Nincs mutáció	0

1.3.5. Molekuláris diagnosztikai megközelítések

A sokáig gold standardnak számító eljárás a Wilson-kór molekuláris diagnosztizálására a direkt Sanger-szekvenálás volt, melyet az ATP7B gén teljes vizsgálatára vagy a családban korábban azonosított mutációk ellenőrzésére szolgált. Történetileg a legtöbb patogén variánst az ATP7B génben polimeráz láncreakció (PCR) és valamilyen más technológia kombinációval írták le, például restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (RFLP), egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP), denaturáló grádiens gél elektroforézis (DGGE) vagy denaturáló nagy teljesítményű folyadék kromatográfia (DHPLC) majd pedig Sanger-szekvenálás alkalmazásával [171-172]. A folyamat komplexitása gyakran igen hosszú vizsgálati időket okozott és a detekciós rátája sem elég magas ahhoz, hogy minden mutációt felismerjen. A molekuláris vizsgálatot egyszerűsítheti a populáció specifikus gyakori mutációk első körben való analízise, azonban a Wilson-kórban jellemzően egy-két ilyen mutáció van, a második mutáció megtalálásához elkerülhetetlen valamilyen komplexebb megközelítés alkalmazása. A biokémiai markerek gyakran nem elég precízek, például a vizelet rézürités gyakran csak a betegség előrehaladtával válik jelentőssé, a preszimptomatikus páciensek körülbelül 40%-a kevesebb, mint 100 mg/nap rezet ürít [173]. Mindezek miatt vált a direkt szekvenálás a Wilson-kór diagnosztikájának gold standardjává. Ha a diagnosztikus procedúra a molekuláris vizsgálattal kezdődik, akkor csökkenthető a szükséges májbiopsziák száma is. A máj rézsztintjét önmagában elégtelen vizsgálni, mert egyes érintett betegekben az csak kismértékben emelkedik meg. A korábban alkalmazott laboratóriumi technikák segítségével az olyan esetek 80%-ában sikerült kimutatni a biallélikus patogén elváltozást az ATP7B génben, ahol a biokémiai és klinikai tesztek valószínűsítették a Wilson-kór diagnózisát. A betegség természete miatt sok páciens nem mutat jellemző, csak enyhe tüneteket. A fals-pozitív esetekben a kezelés rézhiányhoz vezethet, amely hematológiai és neurológiai problémákat okozhat [174]. Mindezek alapján egy megbízható klinikai diagnosztikai kritériumrendszerre és nagy áteresztőképességű DNS vizsgálati módszerre van szükség, még az invazív beavatkozások előtt [175]. Az új-generációs DNS szekvenálási technikák csak korlátozottan alkalmasak nagyméretű genomi deléciók vagy duplikációk azonosítására, ezek előfordulása azonban a Wilson-kór esetében extrém ritka [176]. Ha mégis szükség van a kópiaszám változás vizsgálatára, akkor multiplex ligáció-függő próba amplifikáció

(MLPA) alkalmazható. Az olyan esetekben, ahol csak egy mutációt sikerül azonosítani, az egyéb klinikai és biokémiai paraméterek alapos mérlegelésére van szükség. Mivel a Wilson-kór autoszomális recesszív módon öröklődik, 25% esély van arra, hogy az index páciens testvére szintén érintett legyen. A mutációk azonosítása után az érintett család gyors átvizsgálása is lehetővé válik, a tünetmentes, de a beteggel azonos genotípusú családtagok korai kezelése megelőzheti a később kialakuló komplikációkat. A bizonytalan biokémiai értékekkel rendelkező családtagoknál pedig elkerülhető a szükségtelen kezelés, ha nem igazolódik a génhiba megléte.

Az új-generációs-szekvenálási technikák megjelenéséig a teljes ATP7B gént vizsgáló tesztek nehezen hozzáférhető és költséges vizsgálatnak számítottak, a gén nagy mérete és a mutációk eloszlása miatt. A jelenlegi korszerű technikáknál a legnagyobb kihívást az esetlegesen talált bizonytalan hatású variánsok (VUS) jelentik, és azok klinikai interpretációja. A további családtagok vizsgálata ebben az esetben is segíthet az eltérés fenotípusra gyakorolt hatásának megismerésében, de nem minden variáns sorolható be ezzel a megközelítéssel sem. A fehérjeszerkezetben bekövetkező változások hatását prediktáló számítógépes módszerek csak korlátozottan alkalmazhatóak, azok alacsonyabb analitikai mutatóik miatt.

1.3.6. A Wilson-kór kezelése

A Wilson-kór kezelése két kategóriába osztható [129]: a tüneteket mutató- és az aszimptomatikus páciensek terápiájára. A felosztás alapja az, hogy a már klinikailag is diagnosztizálható kór progressziója valószínűleg gyorsabb és a rézzel összefüggő sérülések visszafordítása érzékenyebb a kezelésig eltelt időre. Tünetmentes hordozók esetében a cél a tünetek prevenciója, ami vélhetően nem igényel sürgősségi ellátást. A kezdeti terápiát követően a tünetek stabilizálódnak vagy meg is szűnhetnek és a terápia átalakul egy fenntartó kezeléssé. A klinikai jeleket mutató páciensek kezelésének tartalmazni kell kelátort, D-penicillamin vagy trietilén-tetramin alapú készítményt, mely növelni képes a vizelettel távozó réz mennyiségét. A kezdeti magasabb dózist addig adni (20 mg/ttkg), amíg a celluláris réz mennyisége a toxikus szint alá nem süllyed, ez jellemzően 6-24 hónapot vesz igénybe és a májfunkciók javulása is jelzi. Ezt követően a kelátor kezelést egy csökkentett dózisban fenn kell tartani (10-15 mg/ttkg). A dózis csökkentésére azért is szükség van, hogy elkerülhető legyen a réz túlzott kiürítése és

ezáltal egy rézhiányos állapot kialakulása. Alternatív terápiás lehetőség a cink sók adása (például cink-acetát, cink-szulfát formájában), melyek megakadályozzák a réz felszívódását a bélrendszerben. Amennyiben a kelátorok hatástalannak bizonyulnak és a beteg biokémiai paraméterei tovább romlanak, az egyetlen terápiás lehetőség a májátültetés. A tünetmentes hordozók kezelésére szintén kelátorok vagy cink sók alkalmazhatóak, a fenntartó terápiához hasonló dózisban [177]. Egy 405 beteg bevonásával készült retrospektív vizsgálat során azt találták, hogy a neurológiai tüneteket mutató páciensek 38%-ának állapotában 4 évnyi kezelés sem hozott lényegi változást, mely a maradandó agykárosodás lehetőségét veti fel [178]. Emellett az idegrendszeri elváltozásokban szenvedő betegek 20%-ánál jelentkezett a tünetek súlyosbodása, melynek a patomechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Valószínűleg a cöroloplazminhoz nem kötött, szabad réz frakció, terápia indukálta megemelkedése váltja ki a kezelték állapotának rosszabbodását [179].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az osteogenesis imperfecta ritka öröklődő betegség, amely elsősorban a csontrendszer működészavarát okozza. A betegség a tünetek széles skálájával jelentkezhethet, ilyenek a szemfehérje kékes elszíneződése, hallásvesztés, a fogképződés zavara és a csonttörések gyakori előfordulása. Jelenleg kilenc típusát különböztetjük meg. Bár ez egyes típusok különböző klinikai megjelenéssel járhatnak, azok elkülönítése más, (közel tucatnyi) tünetegyüttesektől, szindrómáktól, sok esetben nehézségeket okozhat. A pontos genetikai diagnózis fontossága nemcsak az, hogy az egyes OI altípusokat azonosítja, illetve elkülöníti a betegséget az egyéb multiplex csonttörésekkel vagy csökkent csonttömeeggel járó átfedő fenotípusoktól, hanem segít eldönteni, hogy a visszatérő fraktúrák háttérében esetlegesen gyermekbántalmazás áll-e. Ez utóbbi akkor lehet alapvető, amikor nincs családi kórelőzmény és az egyetlen uralkodó tünet a kisgyermekkorban gyakori csonttörés. Epidemiológiai adatok szerint az újszülöttek és csecsemők körében a fizikai bántalmazás prevalenciája sokkal nagyobb, mint az OI előfordulási gyakorisága. Egy következő diagnosztikai nehézség, hogy az OI néhány klinikai képe, mint például a kék sclera, csecsemőkben normális jelenség is lehet, illetve egy új, de novo mutáció létrejötte esetén családi előzmény nélkül is megjelenhet genetikai megbetegedés.

A Wilson-kór szintén egy ritka, recesszív módon öröklődő betegség, mely egy, a réz ionok szállításában fontos fehérje funkciójának elvesztését okozza. A tünetek jellemző módon a máj progresszív károsodását jelentik (cirrhosis és fibrosis is előfordulhat), illetve kezelés nélkül súlyos, központi idegrendszeri károsodás is bekövetkezhethet.

Hagyományos klinikai tesztekkel gyakran nehéz a differenciáldiagnosztika elvégzése a hasonló tüneteket produkáló betegségektől. A fenti szindrómákhoz jelenleg kapcsolt gének több tucat kódoló szakaszt tartalmaznak, mutációs hot spot nélkül, így ezek vizsgálatára az új-generációs szekvenálás lehet a leginkább alkalmas módszer.

Vizsgálatunk során azt a célt tűztük ki, hogy az **osteogenesis imperfecta** gyakoribb típusainak, illetve a **Wilson-kór** háttérében megbúvó gének **gyors, nagy biztonságú, költséghatékony diagnosztikai vizsgálati módszerét dolgozzuk ki**, új-generációs szekvenálási technika felhasználásával. Ennek az új technológiának a

nagyságrendekkel nagyobb áteresztőképességét alkalmazva a páciens, illetve a klinikus sokkal hamarabb juthat egyértelmű diagnózishoz, mely különösen a Wilson-kór esetében azonnali terápiás jelentőséggel is bírhat. Az osteogenesis imperfecta tünetegyüttesében szenvedő betegek genetikai diagnosztikája hozzájárulhat a pontosabb prognózishoz, továbbá prenatális szűrővizsgálatokkal a majdani családtagoknál a betegség örökítése akár el is kerülhető, illetve posztnatálisan szerepet játszhat a betegség korai felismerésében is.

A talált genetikai eltérések értékelését bioinformatikai módszerekkel tervezzük megvalósítani, több lépcsős értékeléssel. Amennyiben szükséges és lehetőség van rá, a mutációk családon belüli szegregációs analízisét is elvégezzük.

3. MÓDSZEREK

3.1. GÉNPANELEK KIALAKÍTÁSA

Vizsgálatunk célja egy új-generációs szekvenáláson alapuló géndiagnosztikai panel kidolgozása volt, mely egy időben képes több gén teljes kódoló szakaszait vizsgálni az osteogenesis imperfectában szenvedő betegek esetében, illetve képes a Wilson-kór tüneteire felelős ATP7B gén hibáját a gén teljes transzlálódó részén kimutatni.

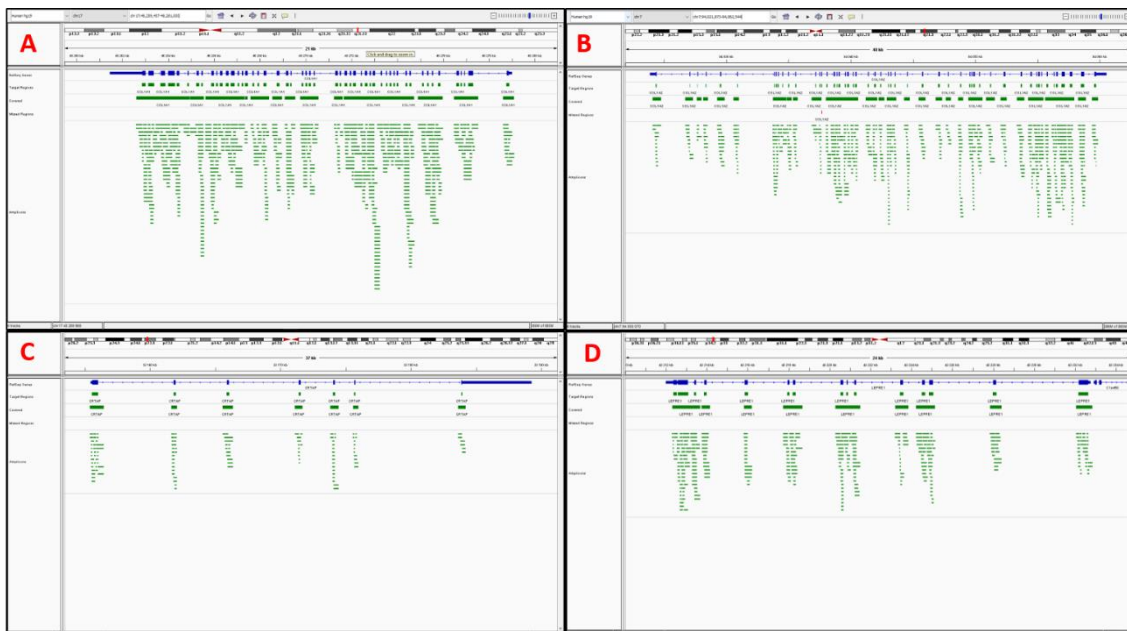
A két vizsgálatra két különböző technikát választottunk: az OI génpanelt szekvencia elfogáson alapuló Agilent HaloPlex módszerrel, míg az ATP7B gént multiplex PCR-t felhasználó AmpliSeq metodikával terveztük feldúsítani a DNS könyvtár készítése során.

A célgének, illetve régiók kiválasztását elsősorban az NIH Genetic Home Reference információi, illetve a betegség-specifikus adatbázisokban lévő adatok alapján végeztük el. Az NIH információs oldala csak 4 gén szerepét emeli ki az osteogenesis imperfecta kialakításában, azonban a specifikusabb Collagene adatbázis (<https://www.le.ac.uk/ge/collagen/>) már húsz gén eltéréseit gyűjti össze. Figyelembe véve, hogy a COL1A1 és a COL1A2 gén hibái az esetek több, mint 90%-át magyarázzák, így mi a négy, leggyakrabban mutáns génnel terveztük meg a HaloPlex próbákat: az 1-es típusú kollagén alfa-1 és alfa-2 mellett a P3H1 (LEPRE1) és a CRTAP régiók exonjait céloztuk meg az Agilent SureDesign szoftver segítségével (8. ábra). A tervezés végén az alábbi lefedettségeket értük el a HaloPlex próbák segítségével:

Gén	Transzkript	Méret (bp)	Exonok száma	Lefedettség (%)
COL1A1	NM_000088.3	4395	52	100
COL1A2	NM_000089.3	4101	52	99,05
CRTAP	NM_006371.4	1206	7	100
P3H1	NM_022356.3	2892	15	100

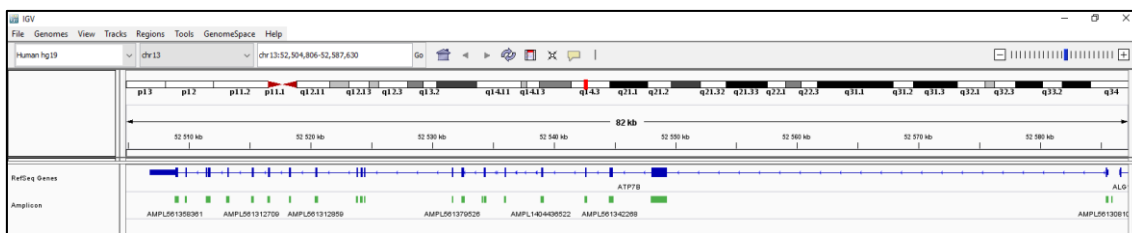
A COL1A2 gén esetében a tervezés sikertelen volt a 234-246 kodonok közötti régióra. Ebben a területben még nem írtak le az irodalomban patogén hatású mutációt,

összesen egy ismeretlen következményekkel járó, valószínűleg benignus misszensz eltérést tartanak nyilván az adatbázisokban (p.(Arg234Cys).



8. ábra: A megcélzott genomi régiók bemutatása az Integrative Genomics Viewer (IGV) segítségével. A „covered” elnevezésű sávban található területek kerülnek analízisre, míg az „amplicon” sávban láthatóak a valós amplikonok melyek szekvenciája ténylegesen meghatározásra kerül. A: COL1A1 B: COL1A2 C: CRTAP D: LEPRE1

A Wilson-kór genetikai diagnosztikájához az ATP7B (NM_000053.3) gén vizsgálatára van szükség. A klinikailag kategorizált ATP7B variánsokat tartalmazó ClinVar adatbázis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) jelenleg 600 eltérést tart számon, azonban az Albertai Egyetem fókuszált adatbázisában összesen 1610, fenotípusos hatás szerint osztályozott szekvencia variáció adatai találhatóak meg. Ezek alapján az ATP7B gén mind a 21 kódoló exonja (5299 bp) mellett néhány távolabbi, intronikus régiót is figyelembe vettünk a tervezés során. A PRNP gén egy polimorfizmusáról ismert, hogy hatással lehet a Wilson-kórban tapasztalható neurológiai tünetek súlyosságára, ezért ezt a gént is belevettük a vizsgálatba. A kapott primer keverékek 2 pool-ba rendezve lefedték a választott genomi területek 99,68%-át (9. ábra), 76 amplicon segítségével.



9. ábra: Az AmpliSeq multiplex primerek tervezésének eredményének vizualizálása az IGV segítségével. A tervezés sikertelen volt az ATP7B gén 5. exonjában lévő 610-616 kodonok között. Ennek következtében a szekvenálás során nem tudjuk detektálni az ebben a régióban előforduló káros eltéréseket (p.Arg616Trp, p.Arg616Gln).

3.2. BIOLÓGIAI MINTÁK GYŰJTÉSE

Vizsgálatunkhoz hat, osteogenesis imperfectában szenvedő páciensből (2 nő és 4 férfi) a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika segítségével, míg hat, klinikailag Wilson-kór tüneteit mutató betegből (1 nő és 5 férfi) a Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika közreműködésével gyűjtöttünk be perifériális vérmintákat. Minden beteg írásban beleegyezett a genetikai vizsgálat elvégzésébe és genetikai tanácsadásban részesültek a vizsgálat előtt- illetve után. A genetikai vizsgálatok a PentaCore Laboratórium genetikai laboratóriumában készültek.

3.3. DNS IZOLÁLÁSA

A begyűjtött perifériás vérmintákból genomiális DNS-t izoláltunk Reliaprep Blood gDNA Miniprep System (Promega, Fitchburg, WI, USA) kit segítségével. Alapos homogenizálást követően 200 µl vérmintához 20 µl proteináz K oldatot és 200µl Cell Lysis Buffer-t mértünk hozzá, vortexelést követően 10 percig inkubáltuk 56 °C-on. Ezt követően 250 µl Binding Buffer-t adtunk a mintákhoz és ReliaPrep™ Binding oszlopra mértük át a teljes oldatot. Egy perces, maximális fordulatszámra történő centrifugálás után a gyűjtőcsövekben lévő folyadékot eldobtuk és 500 µl Column

Wash Solution-t mértünk az oszlopokra. Ezt 3 perc, maximális fordulatszámon történő centrifugálás követte, majd a mosási lépést megismételtük még egyszer. 100 µl nukleáz-mentes vízben eluáltuk mintánként az oszlopról a kinyert és tisztított DNS-t.

Az izolált DNS minőségét NanoDrop spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA) határoztuk meg, a 260/280 nm-en történő abszorbancia értékek hányadosát felhasználva. Legalább 1,8-as értéknél ítéltük megfelelőnek a kapott DNS integritását. A DNS koncentrációját Qubit dsDNA HS assay kit segítségével határoztuk meg (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). A fluoreszcens festékből egy 1:200 hígítású munkaoldat készítését követően 1 µl DNS mintát mértünk az interkaláló festéket tartalmazó elegyhez, majd két perces inkubációt követően meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitását.

3.4. AGILENT HALOPLEX KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉS

A folyamat vázlata a 10. ábrán látható. Röviden, a genomiális DNS-t egy 16 restrikciós enzimet tartalmazó keverékkel megemésztjük, a kapott DNS fragmensekhez a célrégióval komplementer HaloPlex próbákat hibridizálunk, melyek tartalmazzák a szekvenáláshoz szükséges szekvenáló adapterek és bárkódok szekvenciáit is.

1) **Genomiális DNS emésztése**

- 2) **HaloPlex próbák hibridizálása, szekvenáló adapterek és bárkódok jelenlétében. Cirkuláris DNS fragmensek keletkeznek, melyek tartalmazzák az Ion Torrent platformra jellemző adaptereket és bárkódokat.**



- 3) **A DNS-próba hibridek elfogása. A próbák biotinizáltsága lehetővé teszi a hibridek elfogását streptavidin borítású, mágneses gyöngyökkel.**



- 4) **A DNS fragmensek PCR amplifikációja, mely szekvenálásra kész, a cél régiókra dúsított mintákat eredményez.**



10. ábra: A HaloPlex könyvtárkészítés folyamata. (HaloPlex Target Enrichment System For Ion Torrent Sequencing Protocol, Version D.4, May 2013, p:14)

1. Genomiális DNS emésztése

A feldolgozni kívánt mintából 225 ng DNS-t hígítunk ki 5 ng/μl koncentrációra, minimum 45 μl térfogatban, nukleáz-mentes vízzel. Ezt követően a restriktív enzimek működéséhez szükséges RE Buffer-t összekeverjük BSA oldattal és 4 μl-t mérünk belőle egy 8 well-es PCR strip mintatárolóiba, mintánként. Ezt követően minden egyes well-be, meghatározott sorrendben, hozzáadunk 0,5 μl-t először a zöld,

majd a piros strip-ben található restriktív enzimekből. Végül hozzáadunk 5 µl-t a hígított DNS mintákból. Az emésztés 37 °C-on végezzük, 30 percig.

2. Emésztett DNS hibridizálása a HaloPlex próbákkal, a cél régiók dúsitása és bárkódolás

Mintánként összekeverünk 50 µl Hybridization Solution-t és 20 µl HaloPlex próbát, valamint a megfelelő 10 µl HaloPlex ION Barcode Primer Cassette-t, mely a szekvenáló motívumokat és a mintánként különböző bárkódokat tartalmazza. Az így elkészült mixhez egyesével hozzámérjük az emésztett DNS fragmentumokat. A próba – DNS fragmens keveréket denaturáljuk 95 °C-on 10 percig, majd inkubáljuk 54 °C-on 3 órán át.

3. A DNS hibridek kihalászása az oldatból

Az előző lépésben keletkezett cirkuláris DNS fragmensek biotint is tartalmaznak (a HaloPlex próbák biotinizáltak), így streptavidines gyöngyök segítségével ezek a fragmensek kihúzhatók az oldatból.

A mintánként 40 µl HaloPlex Magnetic Bead oldatot pipetázunk egy csőbe és mágneses állványba helyezve szobahőmérsékleten 5 percig inkubáljuk. Ezt követően leszívjuk majd eldobjuk a felülúszót és mintánként 40 µl Capture Solution-t mérünk a gyöngyökre. Az így elkészített gyöngyöket hozzáadjuk a mintákhoz és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezután mágneses állványba tesszük a mintákat, eldobjuk a felülúszókat. 100 µl Wash Solution-t adunk a gyöngyökhöz és 46 °C-on 10 percig inkubáljuk. A következő lépésben visszatesszük a mintákat a mágneses állványra és leszívjuk a felülúszót.

4. A cirkuláris, kifogott DNS fragmensek ligálása

Ebben a lépésben egy ligálási reakcióval bezárjuk a cirkuláris fragmensekben meglévő DNS bemetszéseket, nick-eket.

Összekeverünk 47,5 µl Ligation Solution-t és 2,5 µl ligáz enzimet, az elfogott mintákhoz adjuk és 55 °C-on 10 percig inkubáljuk.

5. Az elfogott és ligált DNS eluálása a mágneses gyöngyökről

A ligált, cirkuláris DNS fragmenseket tartalmazó csöveket mágneses állványba helyezük és eldobjuk a felülúszót. Ezután 100 µL SSC Buffer-t adunk a mintákhoz, vortexeljük majd ismét a mágneses állványba tesszük őket. A folyadék leszívása után 25 µL 50 mM-os NaOH oldatot adunk a mintákhoz és 1 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk őket. A mágnes segítségével ismét megkötjük a gyöngyöket és a felülúszóból mintánként 20 µL-t adunk az alábbi PCR mixhez:

Nukleáz-mentes víz	16.1 µL
5X Herculase II Reaction Buffer	10 µL
dNTPs (100 mM, 25 mM for each dNTP)	0.4 µL
HaloPlex ION Primer 1 (25 µM)	1 µL
HaloPlex ION Primer 2 (25 µM)	1 µL
2 M Acetic acid	0.5 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase	1 µL
Total	30 µL

A PCR ciklizálást egy denaturálás előzte meg, 2 percig 98 °C-on. Az amplifikáció 21 cikluson át tartott: 30 sec 98 °C-on, 30 sec 60 °C-on és 1 perc 72°C-on, melyet 10 perc végső extenzió követett 72 °C-on.

6. Az amplifikált DNS könyvtárak tisztítása

Ebben a lépésben paramágneses (csak mágnes közelében viselkednek mágnesesen, így nem csomósodnak össze a saját oldatukban és csapódnak ki) gyöngyök segítségével (Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckmann Coulter, CA, USA)) eltávolítjuk a DNS könyvtárak mellől a fölösleges primer, próba és más szükségtelen, a további mintafeldolgozást zavaró molekulákat. Ezek a paramágneses gyöngyök az SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization) elvén működnek, a felületükön karboxil csoportok találhatóak, melyek reverzibilisen képesek magukhoz kötni a DNS molekulákat, polietilén-glikol (PEG) és só jelenlétében (20% PEG és 2.5M NaCl

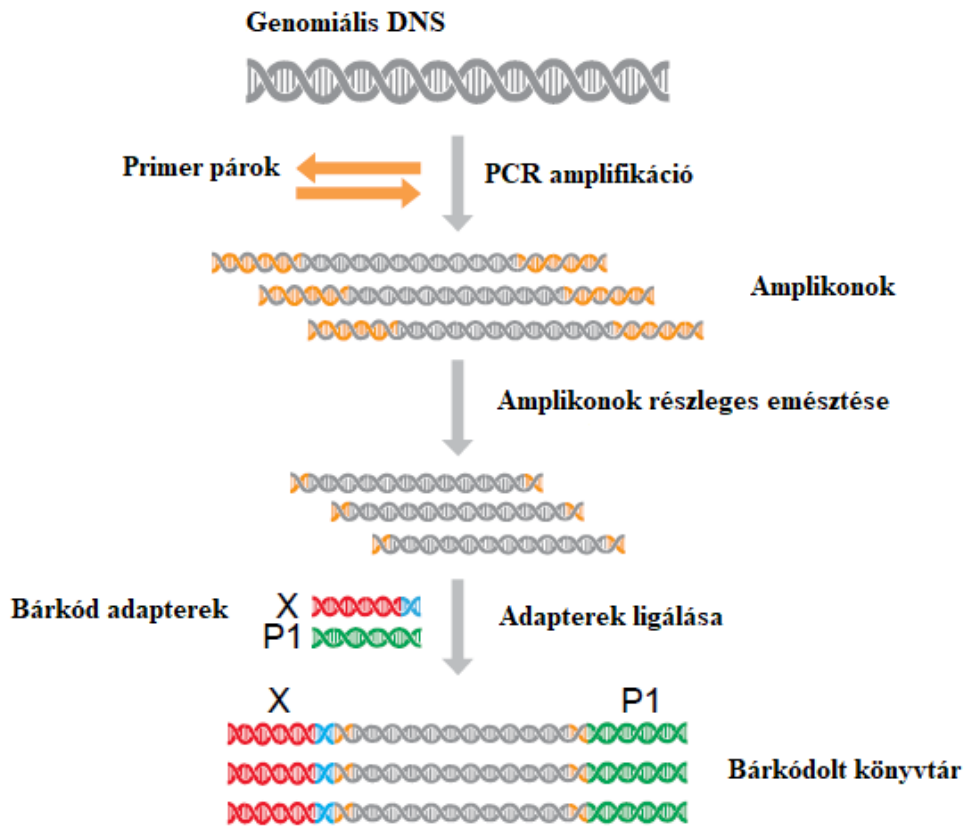
keveréke). Az immobilizáció a NaCl illetve a PEG koncentrációjának függvénye, ezért a gyöngyök és a DNS aránya a döntően fontos ebben a folyamatban.

40 µL PCR termékhez adunk 40 µL nukleáz-mentes vizet és 100 µL szobahőmérsékletű, homogenizált AMPure XP gyöngyöt. 5 percig inkubáljuk, folyamatos rázatás mellett. Ezt követően mágneses állványba helyezük a mintákat, a felülúszót leszívjuk és 200 µL, 70%-os etanolt adunk a gyöngyökhöz. A gyöngyök ülepedését követően az alkoholt eltávolítjuk és megismételjük még egyszer ezt a mosási lépést. A gyöngyöket megszáritjuk és 40 µL low TE puffert mérünk rájuk. 2 perc várakozást követően ismét mágneses állványba helyezük a csöveket, a felülúszó tartalmazza a kész DNS könyvtárat.

Tapasztalataink szerint szükség van egy második tisztításra is, különben a szekvenálást követően nagy számban kapunk a humán genomhoz nem illő, rövid szekvenciákat is, melyek mennyisége gyakorlatilag eltűnik, egy második tisztítást követően.

3.5. AMPLISEQ KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉS

A folyamat vázlata a 11. ábrán látható. Röviden, a genomiális DNS-ből multiplex PCR segítségével felsokszorozzuk a vizsgálni kívánt régiókat, a kapott ampikonokat részlegesen visszaemésztjük, majd bárkódolt szekvenáló adaptereket ligálunk hozzájuk, Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) kit segítségével.



11. ábra: Az AmpliSeq könyvtárkészítés folyamata. (Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 User Guide Revision E.0, p:16.)

1. Multiplex PCR összemérése és a PCR reakció

Mintánként elkészítjük az alábbi PCR oldatokat, mivel a primer keverékek 2 pool-ban találhatóak, így mintánként 2 mixre van szükségünk:

Ion AmpliSeq™ HiFi Mix 5X	2 µL
primer pool (2X) 1 vagy 2	5 µL
Nuclease-free water	2 µL
DNS (10 ng/ul)	1 µL
Total	10 µL

A PCR ciklizálás előtt denaturálást végeztünk, 2 percig 99 °C-on. Az amplifikáció 21 cikluson át történt: 15 sec 99 °C-on és 4 perc 60 °C-on.

2. *Az amplikonok részleges emésztése*

Mintánként 1 μL FuPa reagens hozzáadásával részlegesen leemésztettük a primerkötő helyeket az amplikonokról. Erre azért volt szükség, mert a szekvenátor átlagosan 200bp hosszúságú szekvenciákat képes generálni, így a primerhelyek a számunkra érdekes régiókból venne el. Az emésztést 10 percig 50°C -on, majd 10 percig 55°C -on, végül 20 percig 60°C -on végeztük.

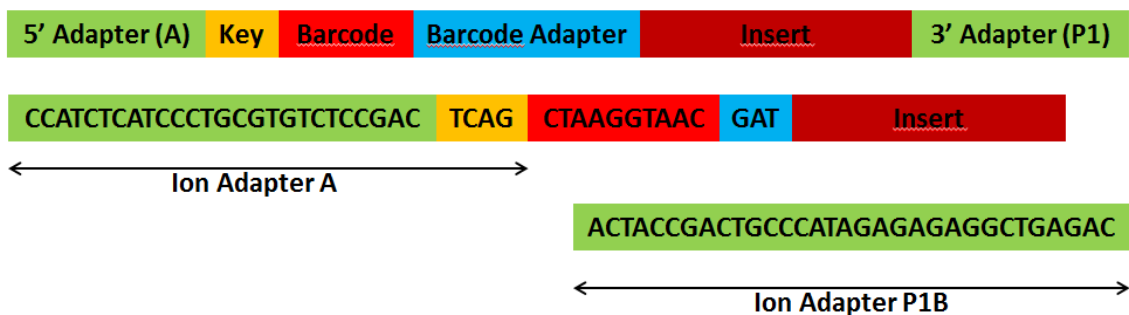
3. *Bárcódolt adapterek ligálása a részlegesen emésztett amplikonokhoz*

Minden mintához 2 μL Switch Solution-t, 1 μL ligáz enzimet és 1 μL bárcódolt adapter mixet adunk (a megfelelő bárcód és a P1 szekvenáló adapter 1:1 arányú keveréke), majd inkubáljuk 22°C -on 30 percig, 68°C -on és 72°C -on 5-5 percig.

4. *Az elkészült könyvtárak tisztítása*

A kész könyvtárakat tartalmazó oldatból Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckmann Coulter, CA, USA) felhasználásával eltávolítottuk a fölösleges primer és adapter szekvenciákat, 22,5 μL paramágneses gyöngyöt adva a mintákhoz. 5 percig szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a mintákat mágneses állványba helyeztük és eldobtuk a felülúszót. A kiülepedett gyöngyöket kétszer megmostuk 100 μL 70%-os etanollal, majd megszáritottuk a csöveket. A tisztított könyvtárakat 25 μL Low TE pufferben eluáltuk.

Mindkét könyvtárkészítési módszer során, a 12. ábrán látható felépítésű DNS fragmenseket állítottuk elő. A fragmensek 5' végén található az A jelzésű adapter, mely a szekvenáló primerekkel komplementer és tartalmazza a minták azonosítására szolgáló kulcs szekvenciát is. Az általunk használt adapterek tartalmazták mind a bárcódot, mind a három nukleotidnyi bárcód adaptert. A célrégió egy darabját adó inzert szekvenciát követi a 3' adapter, mely a szekvenáló gyöngyök (Ion Sphere Particles, ISPs) felszínén lévő szekvenciákra komplementer (12. ábra).

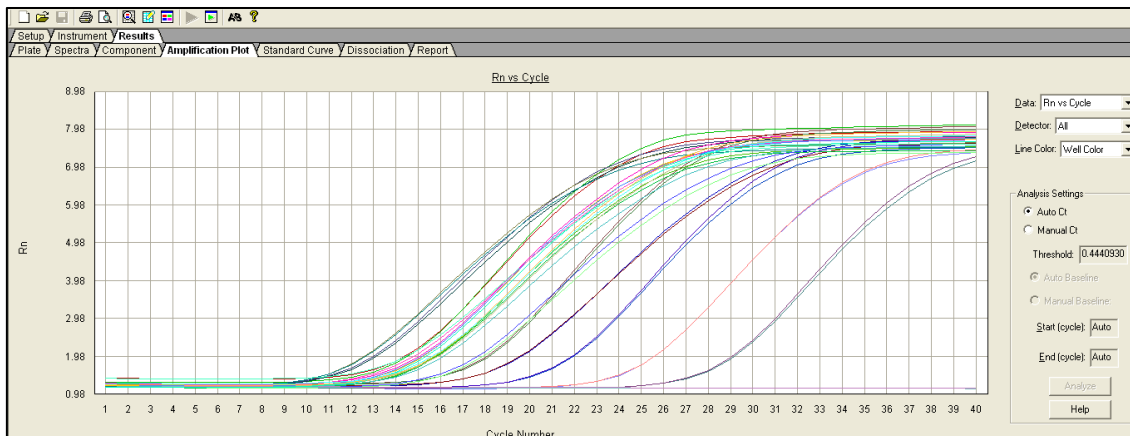


12. ábra: A DNS könyvtármolekula felépítése. HaloPlex technika alkalmazása esetén a P1 adapter kismértékben módosított szekvenciát tartalmaz, hét nukleotiddal hosszabb az 5' végén (GCTGAGG).

3.6. DNS KÖNYVTÁRAK KONCENTRÁCIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA

Az elkészült DNS könyvtárakból szekvenálási templatot kell preparálni, melyhez a lehető legpontosabban kell ismerni a könyvtárak koncentrációját. Ezért a koncentráció meghatározását kvantitatív PCR (qPCR) segítségével végeztük el, abszolút kvantifikációt alkalmazva. E során ismert töménységű kontroll mintákból készített hígítási sor felhasználásával standard egyenest vettünk fel a mérést követően és ezen leolvastuk az ismeretlen mintáink koncentrációját. A mérést az Ion Library TaqMan Quantitation Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) alkalmazásával végeztük el, mely az Ion Torrent platform szekvenáló motívumaira specifikus primer-próba keveréket tartalmaz. A TaqMan próba egy hidrolízis próba, mely az 5'-3' exonukleáz aktivitását használja ki a Taq polimeráznak. A próba 5' végére kovalensen egy fluorofor jelölés van rögzítve, a 3' végére pedig egy quencher molekula. Ameddig a festék és a quencher közel van egymáshoz, addig a quencher blokkolja a festék molekula fény hatására bekövetkező szignál kibocsátását. A Taq polimeráz által végzett kiegészítő szál szintézise közben az enzim az exonukleáz aktivitásával eltávolítja a próbát a templat DNS szárlól. Így távolabb kerül egymástól a festék és az azt gátló quencher molekula, detektálhatóvá válik a fluorofor által kibocsájtott fény. A mért jel egyenesen arányos a DNS mennyiségével (13. ábra).

A mérés előtt a mintákból kétszázszoros hígítást készítettünk, majd 2 percig inkubáltuk azokat 50 °C-on, denaturáltuk 20 sec 95 °C-on, majd 40 cikluson át amplifikáltuk: 1 sec 95 °C-on, majd 20 sec 60 °C-on, ABI 7500 készüléken (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)



13. ábra: DNS könyvtárak koncentrációjának meghatározása qPCR módszerrel. Az amplifikáció során detektált fluoreszcencia görbe inflexziós pontjának meghatározása során kapott érték arányos a bevitt minta DNS könyvtár koncentrációjával, ismert töménységű mintákhoz hasonlítva.

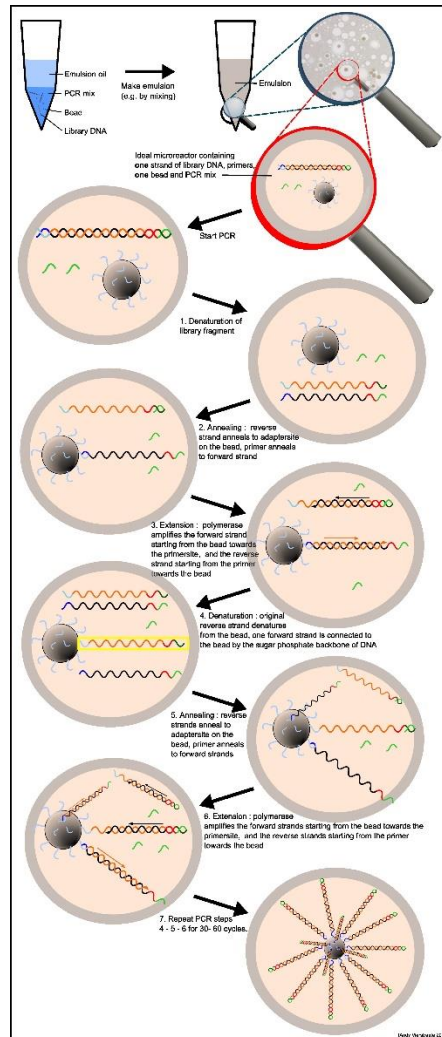
3.7. TEMPLÁT PREPARÁLÁS AUTOMATA EMÚLZIÓS PCR (EMPCR) FELHASZNÁLÁSÁVAL

A DNS könyvtárak közvetlenül nem szekvenálhatók az általunk használt Ion Torrent technikával, azokat előbb egy szekvenáló gyöngy felszínéhez kell rögzíteni és ott klonálisan felszaporítani. Az erre alkalmas technika az emulziós PCR, mely során az olajcseppek belsejében végbemenő PCR reakciók egymástól elzártnak, több milliószorosan párhuzamosítva mehetnek végbe. Ideális esetben egy csepp (mikroreaktor) belsejébe egyféle DNS templát molekula kerül, egy szekvenáló gyöngy és a PCR reakcióhoz szükséges reagensek társaságában. Ezek lesznek a monoklonális gyöngyök, melyek felszínén egyféle DNS szekvencia található meg. Amennyiben többféle DNS fragmens kerül egy mikroreaktor belsejébe, azok szintén amplifikálásra kerülnek, azonban a szekvenálás során ugyanabban a pozícióban különböző szekvenciákat fognak adni, így az analízisben nem vehetnek részt. Ezek a poliklonális

gyöngyök. A poliklonális gyöngyök számát a bevitt DNS templát mennyiségével tudjuk befolyásolni, azonban a rendszer titrálása hirtelen csap át és egy adott DNS fragmens mennyiség alatt, elégtelen mennyiségű DNS tartalmú szekvenáló gyöngy keletkezik. A templát preparálását Ion PGM™ Hi-Q OT2 Kittel (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) végeztük, félautomata Ion OneTouch 2 készüléken. A reakció több lépésből áll (14. ábra):

1. Denaturálás: a reakciót 90 °C fölé melegítve megtörténik a kétszálú DNS könyvtár molekulák szétválása.
2. Anneláció: a reverz szál a P1 adapter segítségével a gyöngyök felszínéhez rögzül, az emPCR primer pedig a forward szálhoz kötődik, az A adapternél.
3. Extenzió: a polimeráz létrehozza a kiegészítő forward szálát a gyöngy felől indulva az A adapter felé, a reverz szálon. Eközben az eredeti forward szálon a P1 adapter felé haladva elkészül az arra komplementer, új reverz szál.
4. Denaturáció: az eredeti reverz szál leválik a gyöngy felszínéről, az új forward szál azonban a cukor-foszfát gerinc segítségével a gyöngyön marad.
5. Anneláció: a reverz szálak a gyöngyöz kötıdnek, a primer pedig a forward szálakhoz.
6. Extenzió: a polimeráz a reverz szálakhoz kötıdve a gyöngy felől indulva elkészíti az újabb forward szálakat, míg a forward szálakon a primerkötő helytől a P1 adapter felé mozogva megszintetizálja az enzim az újabb reverz szálakat.
7. A 2-4 pontokat összesen negyvenszer ismételve a kiindulási DNS könyvtármolekula amplifikálásra került a gyöngy felszínéhez kötıve.

Az emulzió feltörése és az olaj eltávolítása után a felhasznált gyöngyök körülbelül 10-30%-a használható fel.



14. ábra: Az emulziós PCR folyamata egy mikroreaktorban. [180].

A DNS-t a felszínükön nem tartalmazó szekvenáló gyöngyöket egy dúsítási (enrichment) lépésben el tudjuk távolítani az oldatból, így az ilyen gyöngyök nem fognak helyet foglalni a szekvenáló chipben, a szekvenálás során. Az emulziós PCR reakcióban a felhasznált primerek biotiniláltak, így lehetséges az amplifikált ISP-k kikötése az oldatból streptavidin tartalmú mágneses gyöngyök segítségével (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Ez a folyamat az automata Ion OneTouch ES (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) készülék alkalmazásával történt. A DNS tartalmú gyöngyök felszínén lévő kétszálú, amplifikált DNS-t lúgos detergens segítségével (125 mM NaOH és 0.1% Tween® 20) egyszálúsítottuk. Erre azért volt szükség, mert a szekvenálás során a

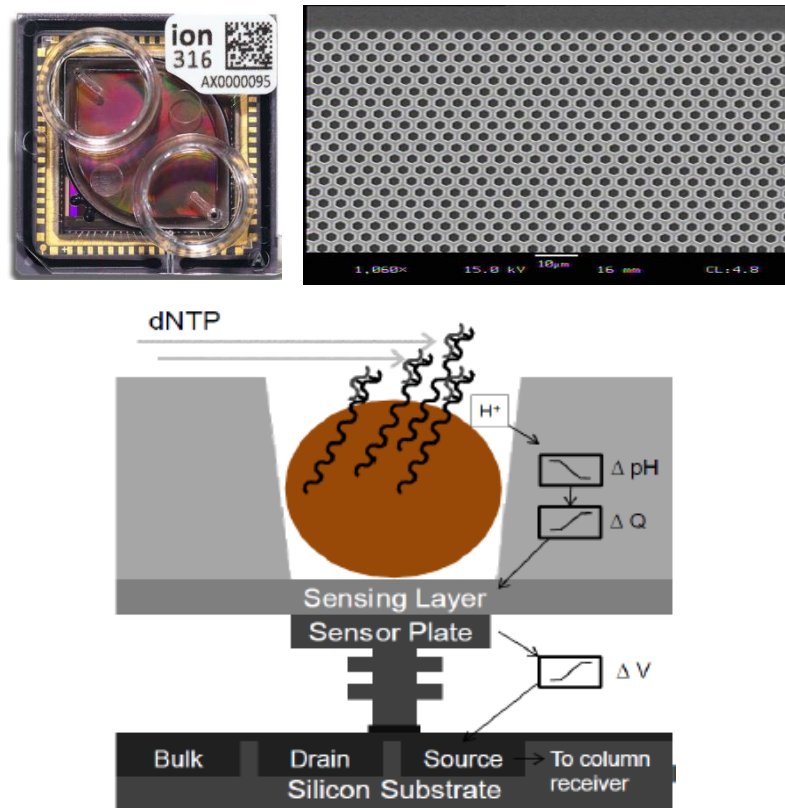
vizsgált régiókra komplementer DNS szál felépítése fog történni (sequencing-by-synthesis). Az így előkészített ISP-k alkalmasak az Ion Torrent PGM™ készüléken való szekvencia meghatározáshoz.

3.8. ÚJ-GENERÁCIÓS SZEKVENÁLÁS ION TORRENT PGM KÉSZÜLÉKEN

A szekvenálás megkezdése előtt kontroll gyöngyöket adunk a mintákat tartalmazó szekvenáló gyöngyökhöz, ezek más kulcs szekvenciát tartalmaznak, így az analízis során külön kerülnek értékelésre és a szekvenálási reakció minőségének ellenőrzésére szolgálnak. Ezt követően az előzőleg elkészített ISP-k felszínén lévő DNS fragmensekhez hibridizáljuk a szekvenáló primereket, melyek az A adapterrel komplementerek. A hibridizáció előtt 2 percig denaturáljuk a reakcióelegyet 95 °C-on, majd 37 °C-on inkubáljuk 2 percig, majd 5 perces szobahőmérsékletű inkubáció során a gyöngyökhöz adjuk a szekvenáló enzimet is. Ezután az ISP-eket betöltjük egy szekvenáló chipbe. Vizsgálataink során Ion 314 (várható áteresztőképesség 500 000 leolvasott szekvencia) és 316 (várható áteresztőképesség 3 000 000 leolvasott szekvencia) v2 BC chipeket használtunk.

A szekvenátor inicializálása és a szekvenálás során Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing kitet (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) használtunk.

Az Ion 314 v2 BC szekvenáló chip felületén 1,2 millió, míg a 316 chipen 6,3 millió well található. Egy wellbe egy szekvenáló gyöngy kerülhet be. A wellben egy ion szenzor található, mely a DNS komplementer szálának szintézise során, az összekapcsolódó nuleotidokból felszabaduló H⁺ által okozott pH, illetve feszültségváltozást képes detektálni (15. ábra). Az így detektált jelek DAT fájlokban kerülnek összegyűjtésre.



15. ábra: Egy Ion 316 v2 BC szekvenáló chip, annak felszíne elektronmikroszkópos képen, illetve az ion szenzor működésének vázlata [181].

A nukleotidok típusonként, egyesével adódnak hozzá a reakcióhoz (flow), egy szigorúan meghatározott sorrendben (flow order), mert ha a négyféle bázis egyszerre lenne jelen, akkor nem lenne információnk a beépülő nukleotidok sorrendjéről. A reakció után a készülék mosó pufferral átmosa a chip felszínét és eltávolítja a maradék nukleotidokat, a következő típusú nukleotid érkezése előtt.

Amennyiben a vizsgálat szekvencián több azonos bázis is található egymás mellett (homopolimer szakaszok), akkor annyi nukleotid épül be egyszerre, amilyen hosszú a homopolimer szakasz. Azonban a detektálható feszültségváltozás nem teljesen egyenesen arányos a nukleotidok számával, ami egy szekvenálási hiba lehetőségét veti fel. A legújabb templát preparálási és szekvenálási reagensek, illetve a megfelelő bioinformatikai módszerek kombinációjával ezek a hibák ma már egyre kevésbé fordulnak elő.

3.9. BIOINFORMATIKAI ELEMZÉS

Az adatelemzés több szakaszra bontható.

1. A DAT fájlokban összegyűjtött nyers feszültségértékeket egy platformspecifikus algoritmus feldolgozza és átfordítja a flow order alapján bázisokra (signal processing / base calling).
2. A base calling során kapott szekvenciákat a Torrent Suite szoftver BAM fájlokban gyűjti ki, bárkódok szerint leválogatva. A poliklonális és alacsony minőségű leolvasásokat a szoftver eltávolítja a további analízisből.
3. Ezt követi a leolvasások referencia genomhoz (hg19) való illesztése (alignment). Ion Torrent adatok illesztésére legjobban a szintén platformspecifikus TMAP (<https://github.com/iontorrent/TMAP>) algoritmus alkalmazható. Az illesztés során létrejövő inzerciókat és deléciók környékén az algoritmus egy második illesztést is végez (re-alignment), ezzel csökkentve a későbbi fals pozitív találatok esélyét. Az illesztett szekvenciákat a program szintén BAM fájlokban gyűjti össze.
4. Az illesztett szekvenciákban van lehetőség a referenciától való eltérések keresésére, a variánsok kivonatolására. A Torrent Suite platformszoftver egy GATK (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) algoritmuson alapuló, összetett variánshívó programot használ, mely VCF és XLS fájlokban menti el a talált variánsokat.
5. A nyers variánsokat tartalmazó VCF fájlok tartalmazzák a variánsok genomi pozícióját, azok típusát és a minőségi jellemzőiket, de biológiai értelmet az annotálás során adhatunk ezeknek a variánsoknak. Erre a célra az Ion Reporter felhő-alapú programot használtuk. Szintén az Ion Reporter segítségével végeztük el az annotált variánsok további szűrését és a populációban gyakrabban (1% felett) előforduló variánsok kizárását a további analízisből.
6. Az utolsó lépésben a megfelelően szűrt genetikai eltérések klinikai interpretációja történik, azok összevetése a vizsgált beteg tüneteivel, illetve az adott eltérés szakirodalomban vagy adatbázisokban szereplő információinak feldolgozása.

7. Az olyan mutációkat melyek nem voltak ismertek korábban és aminosav cseréjével járnak együtt, azoknak a várható hatását *in silico* fehérje szerkezet predikciós szoftverekkel is értékeltük (SIFT, PolyPhen-2).
8. A variánsok értékelése az ACMG által ajánlott kategóriák szerint történt [182].

3.10. A TALÁLT PATOGÉN MUTÁCIÓK MEGERŐSÍTÉSE SANGER-SZEKVENÁLÁSSAL

Az új-generációs szekvenálás során azonosított, klinikai jelentőséggel bíró mutációk jelenlétét Sanger-szekvenálással is megerősítettük. Az ehhez szükséges primereket a Primer 3 Plus program (<http://primer3plus.com>) felhasználásával terveztük meg. A szükséges referencia szekvenciákat a UCSC Genome Browser programból nyertük ki (<https://genome.ucsc.edu>). Az összes szükséges primert 60 °C-os anellációs hőmérsékletre optimalizáltuk, így nem volt szükség másféle PCR ciklizálási kondíciókra a különböző primer párok esetében. Az oligokat az Eurofins Genomics szintetizálta. A PCR amplifikációt JumpStart™ Taq (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) DNS polimeráz mixszel végeztük, 10 perces 95 °C-os denaturációt követően 40 cikluson át (95 °C 30 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 1 perc). A végső extenzió 10 percig tartott 72 °C-on. A PCR sikerességét 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A PCR termékeket enzimatikusan tisztítottuk ExoSAP IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) kit segítségével. A szekvenáláshoz a mintákat BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) kittel készítettük elő és a szekvenálást ABI 3130-as (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) készüléken végeztük, POP7 polimer közegben.

A kapott szekvenciákat a BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) szoftverrel értékeltük ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1. PÁCIENS ADATOK

Az osteogenesis imperfecta vizsgálatába hat beteget vontunk be. Négy férfi- és két nőbeteg vetette alá magát a genetikai tesztelésnek. Életkoruk 1 és 41 év között volt (átlag 12 év), a csonttöréseik száma pedig egy és tíz közé esett (átlag 3). Ahol rendelkezésünkre állt, ott felhasználtuk a betegek csontsűrűség-, szemészeti- és hallásvizsgálati adatait, illetve a családi anamnézist is. Az OI-s betegek adatait a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat: Osteogenesis imperfectában szenvedő betegek klinikai adatai.

* A trauma nélkül előforduló törések anamnézise: Az egyes betegnek két töréses eseménye volt, melyben három csontja törött el (tibia, fibula and radius). A kettes betegnek körülbelül tíz törése volt. A hármask betegnek 3 töréses eseménye volt, melyben három csontja tört (koponya, kulcsont és combnyak). A négyes betegnek szintén 3 töréses eseménye volt, melyben három csontja sérült (tibia, femur és humerus). Az ötös betegnek két csontja tört el, három esemény következtében (tibia, femur). A hatos számú betegnek egy combcsont törése volt, trauma nélkül.

A csontsűrűség (Bone mineral density (BMD)) mérése a lumbális gerinci szakaszon történt, kettős energiájú röntgen abszorpciometrián. (DPX-L, Lunar Corp. Madison, WI, USA). A mért értékek a csontsűrűség csökkenését mutatják, az egészséges csontszövethez képest.

† Az egyes számú beteg a kettes számú beteg fia.

	Nem	Kor (év)	Törések száma *	BMD (L2-L4) g/cm ²	Klinikai jelentőségű variánsok	Anamnézis	Kék sclera	Hallásvesztés
Beteg 1 [†]	Férfi	9	3	0.381	c.391C>T (COL1A1)	Apa és az anyai nagyanya OI-ban szenved	Igen	N/A
Beteg 2	Férfi	41	10	N/A	c.391C>T (COL1A1)	Anyja OI-ban szenved	Nem	Igen
Beteg 3	Férfi	18	3	0.685	c.2072G>A (COL1A2) [‡]	Nem	Nem	Igen
Beteg 4	Nő	2	3	0.390	c.189C>A (COL1A1)	Anyjának kék a sclerája, törés nem volt	Igen	N/A
Beteg 5	Nő	1	3	0.170	c.811G>T (COL1A2)	Anyjának 7 törése volt	Nem	Nem
Beteg 6	Férfi	1	1	0.167	c.750+1G>A (COL1A1)	Nem	Igen	N/A

A Wilson-kór tüneteit mutató páciensek közül szintén hatot (öt férfi- és egy nőbeteg) vontunk be a vizsgálatba. Életkoruk 8 és 44 év közé esett (átlag 18,6 év). Rendelkezésre álltak a szemészeti- valamint a rézanyagcserevel kapcsolatos klinikai vizsgálatok eredményei is. Hemolitikus anémia nem fordult elő a betegeink körében. A betegek adatait a 4. táblázat foglalja össze.

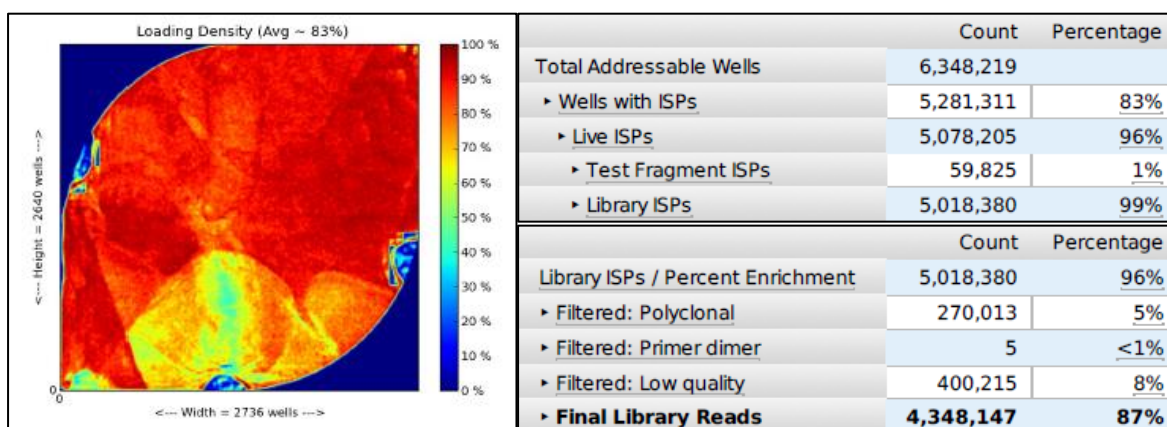
4. táblázat: Wilson-kórral diagnosztizált betegek klinikai adatai. KFR: Kayser-Fleischer gyűrű; Neu: neurológiai tünetek és/vagy CT/MRI eltérések; Rézürítés a vizeletbe: 1-2X ULN: +, 2x ULN vagy pozitív D-penicillamin próba: ++; Cerul: cöroloplazmin; T: korábbi beteg testvére; H1: akut májelégtelenség; H2: krónikus májelégtelenség; N1: neurológiai tünetek májelégtelenséggel együtt; N2: csak neurológiai tünetek. A nemzetközi score rendszer szerint a, 4 vagy magasabb score esetén a Wilson-kór diagnózisa nagyon valószínű. Hemolítikus anémia egyik betegnél sem volt megfigyelhető. A hármas számú páciensből májbiopszia is készült mely Rhodanine festésre pozitív eredményt adott.

	Nem	Első tünet (év)	KFR	Neu	Vizelet réz	Cerul. (g/L)	WD score	Fenot.	ATP7B genotípus
Páciens 1	Nő	12	Igen	Nem	++	0,18	6	T	p.M769fs/ p.H1069Q
Páciens 2	Férfi	17	Nem	Igen	+	0,05	6	N1	p.A1063V/ p.H1069Q
Páciens 3	Férfi	8	Igen	Nem	++	0,06	8	H2	p.G1351X/ p.H1069Q
Páciens 4	Férfi	17	Igen	Nem	+	0,03	5	H2	p.A1135fs/ p.L1305P
Páciens 5	Férfi	44	Nem	Nem	++	0,08	4	H1	p.A1270I/ c.1707+2dupT
Páciens 6	Férfi	14	Igen	Igen	NA	0,04	7	N2	p.R969Q/ p.H1069Q

4.2. A SZEKVENÁLÁSI ADATOK MINŐSÉGI ELLENŐRZÉSE

A szekvenálási futás értékelése során első lépésben a minőségi paramétereket ellenőrizzük. A várható áteresztőképességet csak akkor tudjuk elérni, ha a szekvenáló chip legalább kétharmadát megtöltötték a szekvenáló gyöngyök és ezeknek legalább a kétharmada monoklonálisan amplifikált DNS-t tartalmazott.

A 16. ábrán látható egy Ion 316 chip értékelése a szekvenálás után, mely HaloPlex technikával készült, osteogenesis imperfectában szenvedő betegek mintáit tartalmazta.

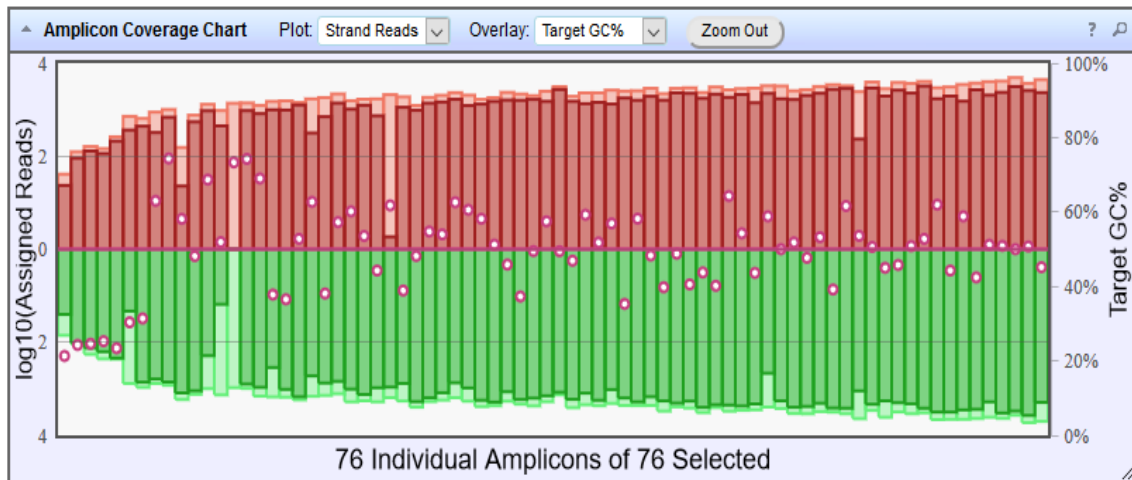


16. ábra: Ion 316 chip statisztikai értékelése a szekvenálás után. A chip töltöttsége 83%-os volt (wells with ISPs), az elfoglalt wellek 96%-a tartalmazott DNS tartalmú gyöngyöt (Live ISPs) és ezek 99%-a általunk készített könyvtármolekulákat tartalmazott, míg a DNS tartalmú gyöngyök 1%-a volt a kontrollgyöngy (Test fragments ISPs). A poliklonális gyöngyök mindösszesen 5%-ot tettek ki, ez nagyon alacsony érték, de a HaloPlex technika alkalmazásával könnyebb elérni a kedvezőbb monoklonális:poliklonális arányt. A leolvasások 8%-a alacsony minőségű volt, így ezeket a rendszerszoftver eltávolította a további analízisből. Ezekből az értékekből láthatjuk, hogy a templát preparálás, a szekvenáló chip betöltése és maga a szekvenálás sikeres volt, megfelelő számban kaptunk szekvenciákat.

A következő ellenőrzési fázis során megvizsgáljuk a könyvtárkészítés során megcélzott régiók lefedettségét, vagyis azt, hogy a vizsgálni kívánt területeket valóban sikerült-e megszekvenálnunk és az egyes szakaszokról mennyi leolvasás keletkezett, hányszoros az exonok átlagos lefedettsége.

HaloPlex technikával vizsgált OI-s betegeink esetében a mintánkénti leolvasások átlagos száma 436 086 volt, a tervezett régiók 98,65%-át sikerült szekvenálnunk, átlagosan 779X lefedettséget érve el. Cutoff értéknek azt választottuk, hogy a célpontok legalább 90%-ának minimum 20X legyen a lefedettsége, ez minden vizsgálat minta esetében teljesült. Összesen 23 különböző variánst azonosítottunk a mintákban (4 patogén, 1 bizonytalan hatású (VUS) és 18 benignus eltérés).

A multiplex PCR technikát használó AmpliSeq könyvtárkészítés során betegenként átlagosan 134 386 szekvenciát generáltunk, mely azt eredményezte, hogy a Wilson-kórral összefüggő régióknak átlagosan 99.46%-át szekvenáltuk meg. A bázisonkénti átlagos lefedettség 1883X volt (17. ábra). Az azonosított variánsok száma betegenként 8-13 között változott, természetesen ezek többsége klinikai hatás nélküli polimorfizmus volt.



17. ábra: Egy vizsgálat Wilson-kóros mintából készített AmpliSeq amplicon könyvtár, amplicononkénti lefedettsége. A piros karikák az ampliconok GC tartalmát jelzik, százalékban. A piros színű oszlopok a forward, a zöld színű oszlopok pedig a reverz irányú leolvasások számát mutatják. A világosabb színű oszlopok az összes leolvasás számát jelzik, a teli oszlopok pedig azok mennyiségét, melyek végig érnek az egész ampliconon. Néhány fragmens esetében az ideális, fele-fele arányú forward és reverz irányú szekvenciák kismértékben eltolódhatnak egyik irányba. Ennek a bioinformatikai értékelés során lehet hatása, egy variáns fals pozitivitásának esélyét növeli, ha nem egyforma arányban jelenik meg mindkét irányból (strand bias). Látható továbbá, hogy a PRNP 129-es kodonját lefedő amplicont nem sikerült teljes hosszában átszekvenálni, ez az oka a 100% alatti teljes lefedettségnek.

4.3. OSTEOGENESIS IMPERFECTÁVAL DIAGNOSZTIZÁLT BETEGANYAGBAN TALÁLT MUTÁCIÓK

Három új genetikai variációt azonosítottunk. Ezekből kettőt (NM_000088.3(COL1A1): c.189C>A és NM_000089.3(COL1A2): c.811G>T) patogénként értékeltünk. A heterozigóta c.189C>A variáns a COL1A1 gén második exonjában található. A mutáció egy stop kodont hoz létre és ezáltal a transzláció korai megállását okozza. A szintén heterozigóta c.811G>T eltérés a 271. glicin aminosav

cseréjét okozza ciszteinre a COL1A2 gén termékében. Ez a genomi pozíciót a 17. exonban már korábban leírták káros mutáció helyeként, abban az esetben viszont egy G>C báziscsere és ezáltal egy glicin > arginin aminosavcsere történt. A G>T szubsztitúció eddig nem szerepelt a szakirodalomban. Az általunk használt fehérje funkciót prediktáló szoftverek (SIFT, PolyPhen-2) mindegyike kártékony hatásúként osztályozta ezt a variánst. Mindkét aminosavcsere esetében a semleges töltésű, apoláros karakterű glicin egy töltéssel rendelkező, poláros oldalláncú aminosavra cserélődik le. Elvégeztük a c.811G>T mutáció célzott analízisét az érintett családban és a mutációt heterozigóta formában az OI fenotípusú családtagokban találtuk csak meg.

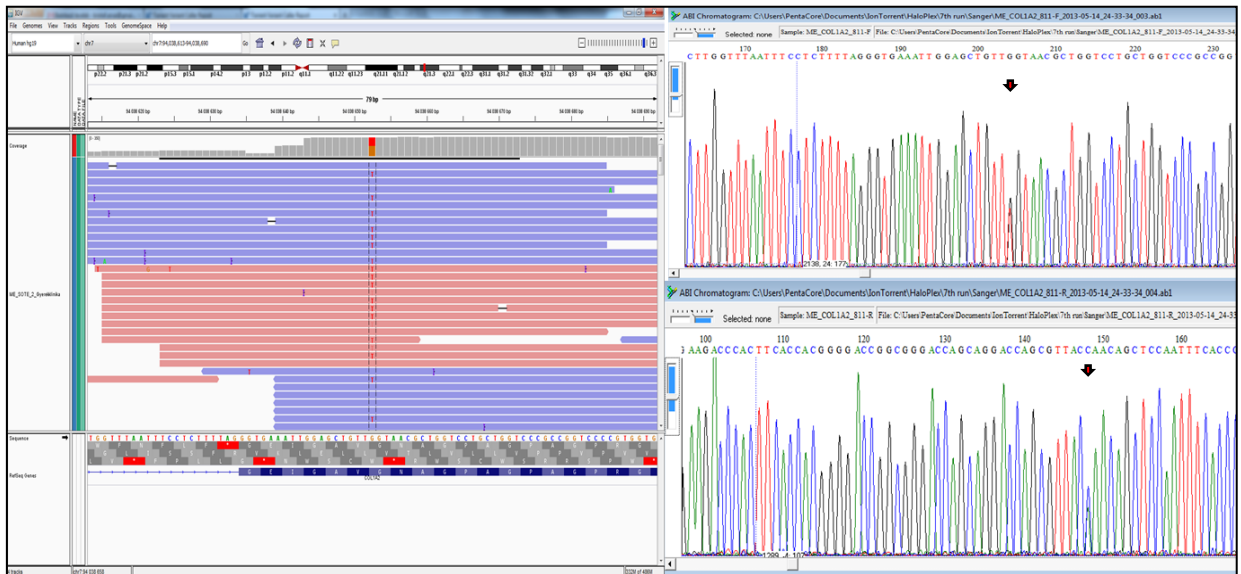
A COL1A2 gén 31. exonjában azonosítottunk egy heterozigóta (NM_000089.3(COL1A2):c.2072G>A) variánst, mely a 691. glicin cseréjét okozza aszparaginra. A felhasznált predikációs szoftverek mindegyike szerint a mutáció káros hatású a fehérjeszerkezetre, az egészséges népesség körében nem fordul elő. Szegregációs adatok azonban nem álltak rendelkezésünkre, így ezt az eltérést bizonytalan hatásúként értékeltük (variant with uncertain significance, VUS).

Két betegünkben korábban már az irodalomban leírt heterozigóta, patogén mutációkat találtunk: NM_000088.3(COL1A1):c.391C>T és NM_000088.3(COL1A1):c.750+1G>A. A c.391C>T szubsztitúció korai stop kodont idéz elő (p.Arg131Ter), míg a c.750+1G>A mutáció a 10. intronban okozza a splicing hely megváltozását, mely abnormális exon-intron splicing folyamathoz fog vezetni.

A variánsok mindegyikét sikeresen erősítettük meg bidirekcionális Sanger-szekvenálással is, az új-generációs szekvenálás találati közt nem volt fals pozitív variáns hívás (18. ábra). A talált variánsokat az 5. táblázatban foglaltuk össze.

5. táblázat: Az azonosított variánsok listája a vizsgált OI-s betegekben. A legtöbb eltérést tartalmazó, legpolimorfabb géneknek a COL1A1 és COL1A2 gének bizonyultak. A † szimbólum jelzi az újonnan azonosított variánsokat. A COL1A2 c.811G>T patogén mutációkra ismert lókuszt, azonban a G>T báziscserét ezidáig nem írták le az irodalomban. N/A: nincs adat, MAF: minor allele frequency (ritkább allél gyakorisága) a dbSNP vagy az ExAC adatbázisából.

Gén	dbSNP azonosító	DNS hatás	Fehérje hatás	Variáns típusa	MAF
COL1A1	N/A	c.189C>A†	p.Cys63Ter	patogén	N/A
COL1A1	N/A	c.391C>T	p.Arg131Ter	patogén	N/A
COL1A1	N/A	c.750+1G>A	Splice site	patogén	N/A
COL1A1	N/A	c.2427C>G	p.(=).Gly809	szinonim variáns	N/A
COL1A1	rs17857117	c.4313C>G	p.Pro1438Arg	misszensz, nem-patogén	N/A
COL1A1	rs1800215	c.3223A>G	p.(=).Ala1075	szinonim variáns	T=0.0212/106
COL1A1	rs2734272	c.2298T>C	p.(=).Thr766	szinonim variáns	A=0.0002/1
COL1A2	N/A	c.2072G>A†	p.Gly691Asp	bizonytalan hatású variáns	N/A
COL1A2	N/A	c.811G>T†	p.Gly271Cys	patogén	N/A
COL1A2	rs1800222	c.246T>C	p.(=).Asp82	szinonim variáns	C=0.312/682
COL1A2	rs1800248	c.3135C>T	p.(=).Gly1045	szinonim variáns	T=0.089/195
COL1A2	rs42519	c.937-3C>T	Splice site	intronikus	C=0.145/317
COL1A2	rs42524	c.1645C>G	p.Pro549Ala	misszensz, nem-patogén	C=0.147/321
COL1A2	rs412777	c.1446A>C	p.(=)Pro482	szinonim variáns	C=0.3273/1639
CRTAP	rs1135127	c.1032T>G	p.(=).Thr344	szinonim variáns	G=0.281/614
CRTAP	rs1135128	c.1044G>A	p.(=).Ser348	szinonim variáns	A=0.281/614
CRTAP	rs11558338	c.213G>A	p.(=).Leu71	szinonim variáns	A=0.260/568
CRTAP	rs4076086	c.534C>T	p.(=).Asp178	szinonim variáns	T=0.300/656
CRTAP	rs145048208	c.655G>A	p.Gly219Ser	szinonim variáns	A=0.0004/50
LEPRE1	rs3738496	c.2129T>A	p.Phe710Tyr	gyakori misszensz variáns	T=0.141/308
LEPRE1	rs4660662	c.2148T>C	p.(=).Gly716	szinonim variáns	A=0.00003/1
LEPRE1	rs116577636	c.2248G>A	p.Gly750Arg	misszensz variáns	T=0.0012/6
LEPRE1	rs11581921	c.1647G>A	p.Met549Ile	gyakori misszensz variáns	T=0.0575/288



18. ábra: A COL1A2 c.811G>T (p.Gly271Cys) heterozigóta mutáció bemutatása az IGV programban. A lefedettség 296X volt ebben a pozícióban (G: 163X, T: 133X).

A bidirekcionális Sanger-szekvenálás megerősítette a mutáció jelenlétét, mindkét irányból (piros nyilak).

A génpanel tervezésének megfelelően a COL1A2 gén 234-es és 246-os kodonjai között nem tudtunk szekvenciákat generálni, a próbák hiánya miatt, ahogy az 19. ábrán is látható.



19. ábra: A vizsgálatunkból hiányzó genomi régió bemutatása az IGV segítségével. A „missed regions” elnevezésű sávban található területek nem kerülnek analízisre, ennek megfelelően a leolvasásokat tartalmazó „sample reads” sávban nem találunk a COL1A2 gén 15. exonjának 234 és 246 kodonjaihoz illeszkedő leolvasásokat.

4.4. WILSON-KÓRRAL DIAGNOSZTIZÁLT BETEGYAGBAN TALÁLT MUTÁCIÓK

Összesen kilenc, betegséget okozó mutációt találtunk. A leggyakrabban az ATP7B (NM_000053.3) gén 14. exonjában található c.3207C>A (p.H1069Q) eltérés fordult elő, heterozigóta formában, négy betegben. A báziscsere a fehérje ATP loop struktúrájában okoz egy aminosavcserét, hisztidin helyett glutamin épül be a fehérjeláncba.

Három misszensz, heterozigóta, az irodalomban korábban már bemutatott mutációt azonosítottunk betegeinkben. A 13. exonban a 969. arginin cserélődött ki glutaminra (p.Arg969Gln, TM6 domén), a 14. exonban az 1063. alanin helyére került valin (p.Ala1063Val, ATP loop), a 19. exonban pedig az 1305-s pozícióban található leucin mutálódott prolinra (p.Leu1305Pro, ATP hinge/TM7 domén). Új eltérést is találtunk

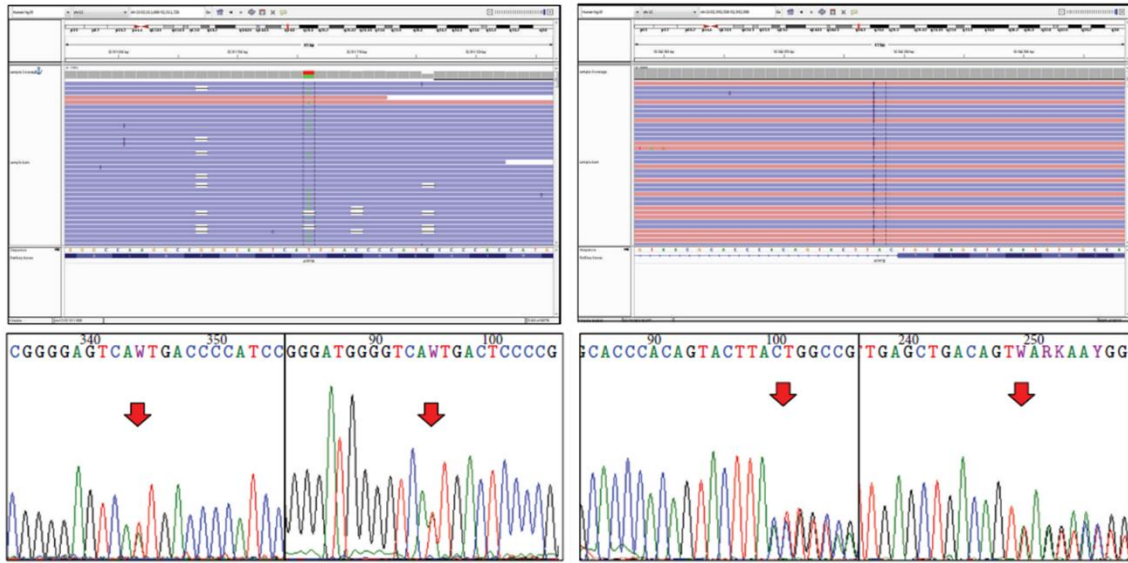
beteganyagunkban (20. ábra): a 18. exonban az 1270-edik alanin változott meg izoleucinra (p.Ala1270Ile, ATP hinge domén).

Három, a leolvasási keret eltolódásával járó, heterozigóta mutációt találtunk, a 4. exonban az exon-intron splicing folyamatát megváltoztató c1707+2dupT eltérést, a 8. exonban egy deléciót (c.2304delC), míg a 15. exonban szintén egy bázis hiányát detektáltuk (c.3402delC).

A 20. exonban egy korai fehérje láncterminációt okozó stop kodon mutációt azonosítottunk, heterozigóta formában, az 1351. glutamin aminosavat követően. (p.Gln1351Ter). A mutációk mindegyikét sikeresen erősítettük meg bidirekcionális Sanger-szekvenálással is, az új-generációs szekvenálás variánsai közt nem volt fals pozitív találat. A talált variánsokat az 6. táblázatban foglaltuk össze.

6. táblázat: Az azonosított mutációk listája a vizsgált Wilson-kóros betegekben. Négy esetben a mutációs hot spot-nak is tartott p.His1069Gln eltérés fordult elő betegekben. A † szimbólum jelzi az újonnan azonosított variánsokat.

Gén	dbSNP azonosító	DNS hatás	Fehérje hatás	Variáns típusa	MAF
ATP7B	rs76151636	c.3207C>A	p.His1069Gln	patogén	0.0009/109
ATP7B	rs137853287	c.2304delC	p.Met769fs	patogén	N/A
ATP7B	rs587783309	c.3188C>T	p.Ala1063Val	patogén	N/A
ATP7B	rs786204578	c.4051C>T	p.Gln1351Ter	patogén	N/A
ATP7B	rs137853281	c.3402delC	p.Ala1135fs	patogén	0.0001/13
ATP7B	N/A	c.3914T>C	p.Leu1305Pro	patogén	N/A
ATP7B	N/A	c.3809A>T†	p.Ala1270Ile	patogén	N/A
ATP7B	N/A	c.1707+2dupT	Splice site	patogén	N/A
ATP7B	rs121907996	c.2906G>A	p.Arg969Gln	patogén	0.00003/4



20. ábra: Az 5. páciens anyagában talált mutációk bemutatása. A c.3809A>T és a c.1707+2dupT heterozigóta eltéréseket is sikeresen erősítettük meg Sanger-szekvenálással (piros nyilak). A 3809-es adenin pozíciójában patogén mutációként már korábban leírták az A>C és A>G báziscseréket is, azonban az A>T szubsztitúció egy új variáns. Az új-generációs szekvenálás során a lefedettség mindkét pozícióban 400X volt (T: 211X, A: 189X és A:189X, T:211X).

5. MEGBESZÉLÉS

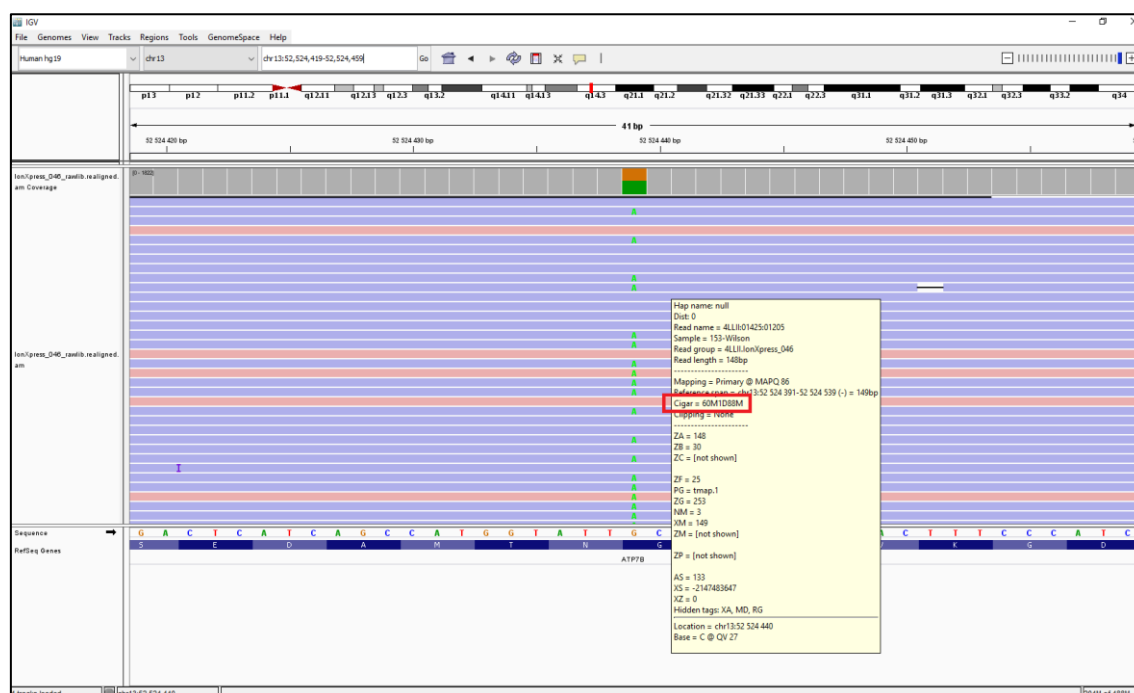
A molekuláris genetika területén az utóbbi időben forradalom-szerű változás következett be. Az első humán genom szekvenciájának meghatározását követően alig tíz év múlva a technológiai lehetővé tette a költségek több nagyságrendbeli csökkenését. A hagyományos, dideoxi lánctermináció alapuló, fluoreszcensen jelölt nukleotidokat felhasználó Sanger-szekvenálást napjainkra több területen felváltotta az új-generációs szekvenálás. A hagyományos szekvenálás továbbra is a legjobb választás, ha egy családban a már előzőleg azonosított mutáció vizsgálatára van szükség, a családon belül. Amennyiben azonban a mutáció még felderítetlen, a gén méretétől függően, a nagyobb áteresztőképességű módszer bizonyul a gyorsabb és hatékonyabb megoldásnak. Ha a diagnózis bizonytalan, akkor különösen nagyobb lehet az új-generációs módszer hatékonyságbeli előnye, hiszen nincs szükség a szóba jöhető gének egyenkénti vizsgálatára, egyetlen laboratóriumi teszttel vizsgálható az összes lehetőség.

Munkacsoportunk az elsők között alkalmazta sikeresen az új-generációs szekvenálási technikát, osteogenesis imperfectával összefüggő gének diagnosztikus célú vizsgálatára. A legtöbb esetben a genetikai teszt eredménye alá tudja támasztani a pontos diagnózist és jelentősen hozzájárulhat az OI klasszifikációjához, különösen az enyhébb fenotípussal járó esetekben. A Collagene adatbázis ma már húsz gén mutációit gyűjti össze, azonban úgy döntöttünk, hogy bár a technológia lehetővé teszi mindnek az együttes vizsgálatát, csak a leggyakrabban hibásnak bizonyuló géneket fogjuk vizsgálni. Az I-es típusú kollagén α -1 és α -2 láncában keletkező destruktív fehérjeszerkezeti változás felelős az összes OI-s eset 90%-áért [183]. A recesszív öröklődésmenettel bíró, relatíve gyakoribb betegségért a további 18 gén felelős, mely az esetek kevesebb, mint 10%-t adja. Ezen gének többségére jellemző a kódoló exonok nagy száma, különösen a kollagént kódoló gének esetében. Az általunk vizsgált négy gén (COL1A1, COL1A2, CRTAP, P3H1) összesen 126 exont tartalmazott, melynek hagyományos módon történő vizsgálata roppant idő- és költségigényes lenne, hiszen a betegséggel összefüggő genomi régiókban nem ismert, hogy lenne mutációs hot spot terület. Az eddig azonosított genomi variációk száma

jelentősen átlépte az ezret is. Jelentősen tudja csökkenteni a hagyományos szekvenálás igényét egy-egy mintának, ha valamilyen olcsóbb és nagyobb áteresztőképességű módszerrel megtörténik az exonok mutációs előszűrése. Ilyen korszerű előszűrő módszer a nagyfelbontású olvadási görbe analízis (HRM) [183]. A módszer lényege, hogy a vizsgálni kívánt szakaszokat PCR reakcióval amplifikáljuk, majd fluoreszcens, interkaláló festék jelenlétében denaturáljuk a kész PCR termékeket. A DNS kétszálú hélixszerkezetének megszűnésével az addig interkalálódott festék felszabadul és ez egy fluoreszcens jelintenzitás csökkenést fog okozni. A mutáns allélt hordozó DNS fragmensek esetében más hőmérsékleten következik be ez a változás, így más lesz a fluoreszcencia intenzitását vizsgáló görbe időbeli lefutása. Maga a módszer a mutáció molekuláris természetéről nem ad információt, így a vad típustól eltérő lefutású fragmenseket minden esetben szekvenálással kell tovább vizsgálni és megállapítani a pontos genotípusukat. A génszkennelés egy olcsó és hatékony módszer a nagyobb gének előszűrése, azonban több tucatnyi exon esetében a PCR amplifikáció és olvadásigörbe analízis már nem nevezhető egyszerűnek, továbbá az előszűrő módszerek szenzitivitása és specificitása elmarad a szekvenálás mellett. Új-generációs szekvenálással végzett mintaanalízis esetén elégséges a klinikailag releváns mutációkat megerősíteni Sanger-szekvenálással, illetve kellő mennyiségű minta bioinformatikai vizsgálatát követően a konfirmációs tesztek száma is jelentősen csökkenthető. Az illesztett szekvenciákat tartalmazó BAM fájlok manuális ellenőrzése során, az orvosi szempontból fontos eltérés régiójában, érdemes az úgynevezett Compact Idiosyncratic Gapped Alignment Report (CIGAR) értékét megvizsgálni (21. ábra). Ez az érték mutatja meg, hogy az adott szekvencia hogyan illeszkedett a referenciához. Többféle értéket is felvehet ez az illesztési mutató, a fontosabbak:

D	Deléció, a nukleotid jelen van a referenciában, de hiányzik a leolvasásban
H	Hard Clipping, a levágott szakasz nincs jelen a leolvasásban
I	Inzerció, a nukleotid jelen van a leolvasásban, de hiányzik a referenciában
M	Match, a nukleotid jelen van a referenciában, az illesztés megfelel ennek
N	Kihagyott régió, a régióhoz illő nukleotidok nem találhatóak meg a leolvasásokban
S	Soft Clipping, a levágott nukleotidok jelen voltak a leolvasásokban

Amennyiben egy, az informatikai elemzés során meghívott eltérésnél azt látjuk a CIGAR értékekből, hogy a variánst tartalmazó leolvasások illesztése nagy mennyiségben tartalmaz levágott nukleotidokat, illetve váltakozó deléció/inzerciót és illeszkedő bázisokat, akkor a variánsnál felmerül a fals pozitívitás esélye és az, hogy amit látunk az az illesztést végző algoritmus műterméke.



21. ábra: Az egyik Wilson-kóros mintában talált c.2544C>T heterozigóta polimorfizmus bemutatása IGV programban. Az adott leolvasás CIGAR értékéből leolvasható, hogy az illesztés során 60 nukleotid pontosan illeszkedett, ezt követően az algoritmus egy gap-et, deléció-t nyitott az illesztésben, majd az ezt követő 88 bázis ismét pontosan illeszkedett a referencia genomhoz (60M1D88M).

Ilyen variánsok esetében gyakrabban fordul elő az is, hogy az eltérést nem egyenlő arányban találjuk meg a forward és reverz irányú leolvasásokban. Hasonló figyelmeztető jel lehet, ha olyan genotípusú mutációt találunk, ami ellentmond a biológiának, tehát homozigóta patogén eltérést találunk csírvonalas mintában, miközben a vizsgált gén domináns öröklődésű betegséghez kapcsolódik. A talált variánsok ilyen mérvű megítélése csak a kellő tapasztalat megszerzése után lehetséges, amikor már jól ismerjük az alkalmazott technológia (mind a könyvtárkészítés, mind a szekvenálás esetében) jellegzetességeit.

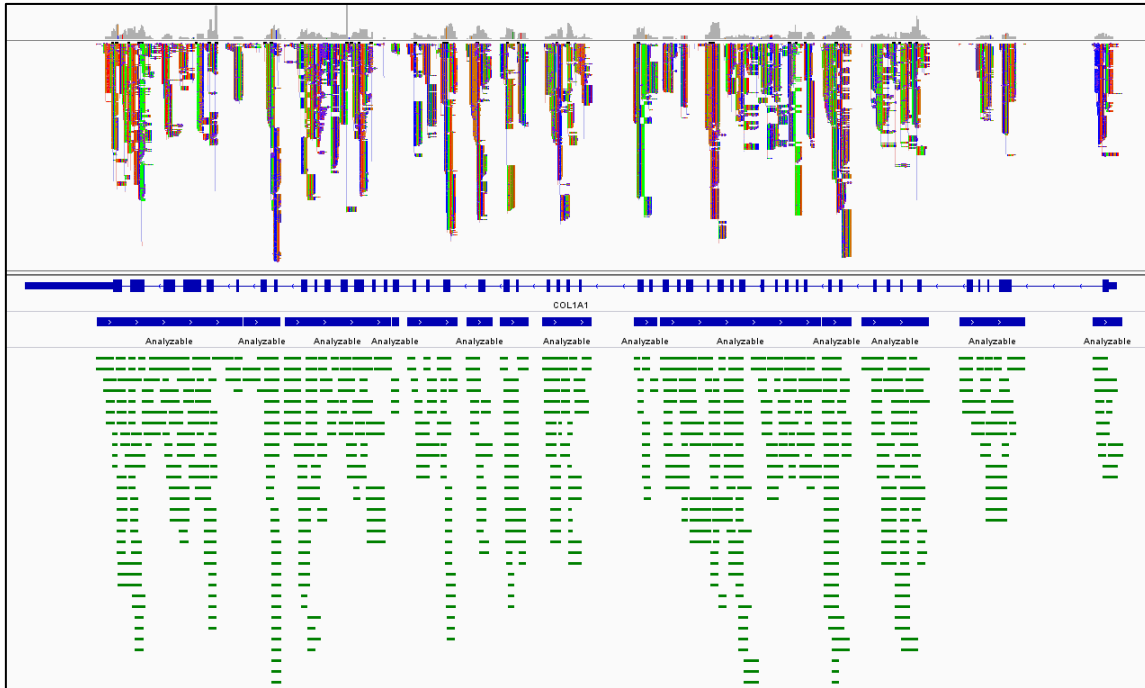
Az osteogenesis imperfecta mellett más, alacsony- illetve magas csontsűrűséggel járó csontbetegségek esetében is demonstrálták már az új-generációs szekvenálás alkalmazhatóságát [184], összesen 34 gént vizsgálva egyidejűleg. Az Amerikai Orvosi Genetikusok Kollégiumának (ACMG) ajánlása szerint törekedni kell az olyan vizsgálatok végzésére, mely csak olyan géneket tartalmaz, amik kapcsolata az adott betegséggel jól ismert és egyértelmű. Emellett a lehetőségekhez mérten úgy kell megtervezni a genetikai teszteket, hogy várhatóan a lehető legkevesebb számú bizonytalan hatású variáns keletkezzen, melyek interpretálása nem könnyű, továbbá a beteg számára csak további vizsgálatokat és bizonytalanságot eredményezhet [182]. A vizsgált gének számának bővítése növeli a bizonytalan eredmény valószínűségét, mely csökkentheti egy teszt klinikai hasznosságát is.

Mindezeket figyelembe véve döntöttünk négy olyan gén vizsgálatára mellett, mely molekuláris genetikai teszt segítségével a klinikailag osteogenesis imperfectával diagnosztizált betegek várhatóan több, mint 90%-ának tudunk biztos eredményt adni. Amennyiben a teszt nem tudja megerősíteni az OI diagnózist, felvetődik a nagyméretű genomi átrendeződések vizsgálatának lehetősége, MLPA módszerrel. Az ilyen nagy deléciók és duplikációk előfordulása ritka, 1-2% körüli [185]. Amennyiben se biokémiai, se genetikai vizsgálat nem tudja alátámasztani a dominánsan öröklődő osteogenesis imperfecta diagnózist, akkor felmerül a lehetősége annak, hogy a páciens valamilyen már genetikai betegségben szenved, mely részben hasonló fenotípus létrehozására képes. Jelenleg közel tíz olyan klinikai képet ismerünk, melyet számításba kell venni az OI differenciál diagnózisánál (Osteomalacia, Bruck szindróma, Osteoporosis-pseudoglioma szindróma, Cole-Carpenter szindróma stb.). Ha a röntgenfelvételek egyértelműen igazolják az osteogenesis imperfecta meglétét,

negatív genetikai teszt mellett, akkor felmerül a ritka, recesszív öröklődésű OI lehetősége. Ennek tesztelésére egy szélesebb körű génpanel alkalmazásával van lehetőség.

A tanulmányok szerint a gyermekbántalmazás gyanús esetek mindössze 5%-ánál igazolódik a csontok betegsége [186]. Ha ezt összevetjük azzal, hogy a valós OI-s esetek 90%-ánál igazolódik az egyes típusú kollagén valamely láncának hibája, a recesszív formák pedig egyértelmű röntgeneltérést mutatnak, akkor a maradék kockázata annak, hogy egy gyermek osteogenesis imperfectában szenved, megközelítőleg 0,5%.

Az általunk választott módszerrel 23 különböző variánst azonosítottunk a vizsgált 4 génben. Ezek közül három, eddig még nem ismert mutációt is azonosítottunk (egyét a COL1A1 és kettőt a COL1A2 génben), melyek a publikálást követően bekerültek a Collagene adatbázisába is. A domináns öröklődésmentnek megfelelően ezek mindegyike heterozigóta volt. A HaloPlex könyvtárkészítési technika egy némileg összetettebb metodikának bizonyult, nagyobb DNS igénnyel (225 ng). A költsége állandó, a szekvencia elfogáshoz szükséges egyedi próbákat mindig az adott reagens készlet tartalmazza, nem szükséges azt előre, nagyobb mennyiségben beszerezni. Az átfedő próbák alkalmazása miatt a lefedettségben nagyobb különbségek is előfordulhatnak (hasonlóan az AmpliSeq technológiához, ahol a fragmensek különböző amplifikálhatósága okozhatja ezt). Az olyan régiókban, amikkel több próba is átfed ott a lefedettség magasabb lesz, míg a kevesebb próbával kifogott részt alacsonyabb számú leolvasást fog generálni. Emiatt a szekvenálási futást úgy kell megtervezni, hogy a kevesebb próbával lefedett területekről is elégséges számú szekvencia keletkezzen. Figyelembe kell venni azt is, hogy a könyvtárkészítés során alkalmazott restriktív enzimkeverékkel történő DNS emésztés miatt olyan fragmenseket is ki fogunk halászni az átfedő próbákkal, melyeknek akár nagyobb része is kívül esik a számunkra érdekes genomi területektől. Ennek az a következménye, hogy a szükségesnél nagyobb méretű régiót fogunk szekvenálni, amivel szintén kalkulálni kell a vizsgálat tervezése során (22. ábra).



22. ábra: A COL1A1 génhez illeszkedő leolvasások vizualizálása az IGV programmal. Az ábra alsó felén láthatóak zöld színnel jelölve a HaloPlex próbák, melyek összessége adja ki az analizálható régiókat. Ezek nem korlátozódnak a kódoló exonokra, több intront is magukban foglalnak, ezzel növelve az elégséges lefedettséghez szükséges leolvasások számát. A szekvenciák mennyisége és ezáltal a lefedettség változása követi az adott területre eső, egymással átfedő próbák számát.

A COL1A1 c.189C > A eltérés az I-es típusú kollagén α -1 lánc szintézisének a korai terminációját okozó stop kodon mutáció. A beteg édesanyjának kékes árnyalatú a sclerája, de trauma nélküli törések nem érték. A vizsgálat gyermek a második életévéig három törést szenvedett el: tibia, femur és humerus törése volt, csökkent, 0.390 BMD (L2-L4, g/cm³) érték mellett. A c.811-es pozíció a COL1A2 gén 17. exonjában egy ismert lokalizációja a patogén hatású mutációknak, azonban az általunk talált G>T szubsztitúciót korábban még nem azonosították. A báziscsere egy glicin aminosav cseréjét okozza ciszteinre, melyek kémiai tulajdonságai szignifikánsan eltérnek egymástól. A cisztein diszulfid hidak kialakítására képes, mely jelentős térszerkezeti változást okozhat a fehérjében, ahogy azt a predikciós szoftverek is egyöntetűen jelezték. Emellett a szegregációs vizsgálat során is mutáció káros hatását megerősítő eredmény született: a család tüneteket mutató tagjai (édesanya és a

fiatalabb lánya) mind hordozói voltak ennek az eltérésnek. A c.2072A > G mutáció a COL1A2 gén 31. exonjában található és szintén egy glicin aminosav változását okozza aszparaginsavra. Az aminosavcsere során egy apoláros tulajdonságú aminosavat vált le egy poláros, negatívan töltött aminosav. A fehérjeszerkezet-funkció predikciót végző algoritmusok szerint a változás káros hatással van az α -2 láncra. A családi anamnézisben nem szerepel osteogenesis imperfectára utaló tünet, így felmerül a mutáció de novo létrejötte. A vizsgálat betegnek három törése volt (koponya, kulcscsont és combnyak), illetve hallásvesztés is megfigyelhető volt nála. Sajnos a család vizsgálatára nem volt lehetőségünk, így a talált eltérést bizonytalan hatásúként értékeltük.

Két ritka, misszensz variánst találtunk a vizsgált betegekben. Ezek a COL1A1 (c.4313C > G) és a CRTAP génben (c.655G > A) voltak találhatóak és a fehérjében bekövetkező aminosavcsérével járnak együtt. Az esetleges patogenitásukról nincs irodalmi adat, ráadásul beteganyagunkban más, biztosan káros hatású mutációkkal fordulnak együttesen elő (a négyes és a hatos betegben), így ezeket valószínűleg benignus génváltozatként kategorizáltuk.

Annak ellenére, hogy a Wilson-kór diagnosztikáját egy nemzetközi score rendszer segíti, a biztos diagnózis felállítása sok esetben még mindig kihívásokkal teli. A tünetek széles skálán jelenhetnek meg, és a klinikai tesztek jellemzően csak alacsony szenzitivitással és specificitással képesek felismerni a betegséget. A genetikai vizsgálat önmagában képes bizonyosságot adni a diagnózist illetően, azonban az ATP7B génben sokféle mutáció fordulhat elő, a gén gyakorlatilag bármely pontján. Egy klinikailag diagnosztizált beteg családtagjainak vizsgálata közben is felmerülhetnek nehézségek, előfordul, hogy a mutációt heterozigóta formában hordozó páciensek is abnormális rézanyagcsere értékeket mutatnak. Az ilyen páciensek szoros követése, ismételt vizsgálata és a diagnózis körüli bizonytalanság főlegesen stresszeli és hozza kényelmetlen helyzetbe őket. Az index beteg genetikai vizsgálata és a kóroki mutációk azonosítása megoldást jelent erre a problémára.

Hagyományos metodikával, az ATP7B gén összes kódoló exonjának PCR amplifikációját követő bidirekcionális Sanger-szekvenálással a közelmúltban

vizsgáltak meg egy nagyobb beteganyagot [133]. Munkacsoportunk elsőként írta le az ATP7B gén új-generációs szekvenálás általi meghatározását, Wilson-kóros betegek esetében. Mivel a káros mutációk a gén kódoló szakaszaiban bárhol előfordulhatnak, ezért a klasszikus Sanger-szekvenálással történő genotípus meghatározás költséges és időigényes lehet. Vizsgálatunk egyértelműen demonstrálja az új-generációs szekvenálás előnyeit. Az alkalmazott multiplex PCR alapú megközelítés nagy hatékonyságúnak bizonyult az ATP7B gén összes releváns régiójának vizsgálatára. Az amplifikáció változatos GC tartalmú amplikonok esetében is robosztusan működött, miközben mindössze 20 ng DNS-re volt szükség a vizsgálat elkezdéséhez. Maga a templát preparálási és szekvenálási technika roppant gyors, néhány óra alatt képes az elemzésre kész szekvenciák előállítására, mely adott esetben közvetlen klinikai haszonnal járhat. Akut májelégtelenség esetén a Wilson-kór biztos diagnózis lehetővé teszi a sürgősségi májtranszplantációt is, mely életmentő lehet. A technika költségigénye a módszer beállításánál egy egyszeri, nagyobb anyagi ráfordítással jár, melyet a multiplex primerek gyártó által elkészített keveréke tesz ki.

A vizsgált betegek mindegyikében sikerült a compound heterozigóta genotípusokat megállapítani, mely a Wilson-kór leggyakoribb genetikai oka, rövid átfutási idővel. A hazai népesség körében leggyakrabban a p.His1069Gln mutáció fordul elő, hasonlóan más Közép- és Kelet-Európai országokhoz [158]. Eredményeink összhangban vannak ezzel, a hat vizsgált esetből négy esetben a p.His1069Gln eltérés volt a betegek egyik mutációja. Érdekes módon p.His1069Gln homozigóta mutációt egyik betegben sem találtunk.

Ismert, hogy a homozigóta eltérést hordozó betegek fenotípusa neurológiai tünetekkel jár együtt, ez a mi beteganyagunkra csak két esetben volt jellemző. A ritkábban előforduló mutációkhoz azok ritka volta miatt ezidáig nagyon kevés esetben sikerült egyértelmű fenotípusos megjelenést kapcsolni.

Az azonosított mutációk az Atp7b fehérje változatos doménjeiben találhatóak: az irodalomban eddig nem ismert p.Ala1270Ile eltérés a 18. exonban kódolt és a fehérje flexibilitásáért felelős összekötő régióban található. A további, korábban már leírt mutációk érintik a hatos és hetes transzmembrán domént, az ATP-kötő helyet, és annak összekötő részét is. Az általunk is megtalált p.Ala1063Val mutáció klinikai hatása kissé vitatott az irodalomban. A p.Ala1063Val mutációt hordozó beteget már a

genetikai teszt eredménye előtt Wilson-kórosként diagnosztizálták. Az eltérést a Wilson-kór specifikus adatbázisban polimorfizmusként kategorizálták, annak ellenére, hogy csak egy publikáció írja le annak [187]. A mutáció bőséges irodalommal rendelkezik, a ClinVar adatbázisában pedig valószínűleg patogén besorolású. Az újabb publikációk [188] szintén kóroki génhibaként tartják számon, így mi is eszerint osztályoztuk.

Egy korábbi közleményben negyven, Wilson-kórban szenvedő betegben vizsgálták Sanger-szekvenálással a prion fehérje genomi szekvenciáját [189]. Mutációt nem találtak a PRNP génben, a c.385A>G polimorfizmus genotípusának eloszlása pedig nem különbözött a kontroll populációhoz képest. Egy nem szignifikáns trend volt azonban megfigyelhető, mely szerint a homozigóta, metionint kódoló genotípus gyakrabban volt megfigyelhető a betegek közt. A szérum réz és cöruoplazmin szintjében, illetve a 24 órás rézüritésben nem volt különbség a homo- és heterozigóta páciensek közt. Szignifikánsan több volt a súlyos neurológiai tünet is a homozigóták közt, erős tremor szinte kizárólag köztük fordult elő. Mindezen adatok összessége alapján elmondhatjuk, hogy a Wilson-kór patomechanizmusában nem vesz részt a PRNP gén polimorfizmusa, azonban a homozigóta genotípus egy neurológiai rizikófaktornak bizonyult, több neurodegeneratív betegség esetében is.

A prion fehérje 129-edik kodonjának polimorfizmusát megvizsgálva nem találtunk ritka, homozigóta variánst. A betegekben heterozigóta genotípus fordult csak elő.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A minél pontosabb genetikai diagnózis felállítása mind a csont-, mind az anyagcserebetegségek esetében fontos. Lehet közvetlen terápiás következménye is, de szerepet kaphat a családtervezés és a genetikai tanácsadás során is. Olyan esetekben, amikor tünetmentes szülőknek születik beteg gyermeke és a betegség dominánsan és recesszíven is öröklődhet, kiemelt jelentőségű annak tisztázása, hogy a gyermek fenotípusának hátterében egy új, de novo mutáció áll, vagy pedig a szülők egészséges hordozók és compound heterozigóta állapot áll fent a betegben.

Anyagcserebetegségek esetében a gyógyszeres kezelés időben való megkezdése és a megfelelő terápia választása döntően befolyásolhatja a betegség progresszióját. Átfedő fenotípusú kórképek esetében a gyors, pontos genetikai vizsgálat adhat segítséget a biztos diagnózis felállításában.

A laboratóriumi technológia és az informatika robbanásszerű fejlődésének eredményeként a korábban roppant összegeket felemésztő genetikai vizsgálatok a kezdeti költségek töredékéért elvégezhetőek, nagyságrenddel kevesebb idő alatt.

Vizsgálataink során célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk az új-generációs szekvenálás alkalmazhatóságát, ritka csont- és anyagcserebetegségek klinikai diagnosztikája során.

Eredményeink alapján mind a szekvencia elfogáson, mind a multiplex PCR technikán alapuló DNS könyvtár készítési technika egy robusztus, nagy hatékonyságú módszer. Költségigénye összevethető, azonban a multiplex PCR-hez szükséges nagyobb mennyiségű primer beszerzése a vizsgálatok kezdetekor egy nagyobb befektetést jelent. Később azonban ez már nem növeli a tesztek költségigényét. A HaloPlex technológia esetében a próbák költsége egyenletesen oszlik el, minden kithoz meg kell venni a szükséges mennyiséget.

A különböző megközelítésekből adódó jelentős különbség az egyes DNS könyvtárak szekvenálási igénye. Mivel az átfedő HaloPlex próbák által elfogott DNS fragmensek jelentősen túlnyúlnak a célzott, kódoló régiókon, ezért a szükséges minimális leolvasások száma jelentősen nagyobb is lehet. Az átfedő próbákból adódóan, egy talált variáns több DNS fragmensről is eredhet, ami csökkenti a fals pozitivitást

valószínűségét. A szekvencia elfogás egy kicsit összetettebb laboratóriumi eljárás, ami nagyobb gyakorlatot igényel.

A multiplex PCR-t használó megközelítés esetében csak a célzott régiók kerülnek amplifikálásra és ezáltal vizsgálatra is, emiatt könnyebb megtervezni egy szekvenálási futást. A módszer hátránya, hogy ahogy nő az amplikonok száma, egyrészt úgy nő a kezdeti primer igény is, másrészt pedig egyre nagyobb eséllyel nő meg az amplikonok kiegyensúlyozatlanságának az esélye. Ez azt eredményezheti, hogy egyes fragmensekről szükségtelenül sok leolvasás keletkezik, míg más amplikonokról elégtelen mennyiségű szekvencia adatot kapunk.

Az osteogenesis imperfecta betegség vizsgálata során szándékosan nem céloztuk meg az összes olyan gént, amiről ismert, hogy összefügg a betegséggel. Arra törekedtünk, hogy a betegség több, mint 90%-át okozó gének mutációt képesek legyünk kimutatni, mely a vizsgálat hat eset mindegyikében sikerült. A HaloPlex szekvencia elfogás nagy hatékonysággal dúsította fel a választott genomi területeket és megbízhatónak bizonyult a variánsinformációk területén is. A talált mutációk különböző tulajdonságai alapján arra következtethetünk, az irodalmi adatokkal összhangban, hogy az osteogenesis imperfectát elsősorban az I-es típusú kollagén α -láncait kódoló COL1A1 és COL1A2 gének egyikének mutációja okozza. A mutációk jellemzően a fehérje szerkezetét befolyásolják, legtöbbször az aminosavak kicserélődését okozva. Előfordulhatnak nonszensz, a fehérjeszintézis korai terminációját okozó mutációk, illetve károsodhat az exon-intron splicing folyamata is. Deléciókat mi nem találtunk a vizsgálatunk során, a Collagene adatbázis szerint a génhibák 16,9%-át adják a leolvasási-kereteltolódását okozó deléciók. Mutációs hotspot nem volt megfigyelhető, szintén az irodalomnak megfelelően, a mutációk változatos régiókban lokalizálódtak. A vizsgált gének nagyszámú kódoló exonból állnak (összesen 126), melyek vizsgálata hagyományos Sanger-szekvenálással igen hosszadalmas és költséges folyamat lenne, előszűrő módszer alkalmazásával pedig mindig fennáll a fals negativitás esélye, az előszűrő módszerek alacsonyabb analitikai mutatóik miatt.

A Wilson-kór vizsgálatánál multiplex PCR alapú, AmpliSeq technikát alkalmaztunk. A DNS könyvtár elkészítése kismértékben egyszerűbb a HaloPlex technikához képest, de hasonlóan megbízhatónak bizonyult. A vizsgálat betegek mindegyikében sikerült a Wilson-kórt okozó compound heterozigóta genotípus diagnosztizálása. A betegség

tüneteként kialakuló akut májelégtelenséget elfogadják a nemzetközi szervezetek is a sürgősségi májtranszplantáció indikációjaként, ehhez azonban gyors diagnózisra van szükség, melyet az új-generációs szekvenálás képes biztosítani. A talált mutációk az Atp7b fehérje különböző doménjeiben okoznak káros változást, mutációs hotspot ebben a betegségben sem igazolódott, az irodalmi adatokkal összhangban.

Az Ion Torrent félvezető-alapú új-generációs szekvenálási technika alkalmasnak bizonyult változatos molekuláris szerkezetű szubsztitúciók és inzerciók-deléciók azonosítására is. A készülék kis helyigényű, különleges infrastruktúrára sincs szükség az üzemeltetéséhez. A szekvenálási futás előkészítése megközelítőleg két és fél órát vesz igénybe, majd maga a szekvenálás hasonló ideig tart. A platformspecifikus bioinformatikai algoritmusgyűjteményhez illesztett grafikus felület könnyen kezelhető és jól testreszabható. A variánshívás teljesen paraméterezzhető, ehhez azonban a platform mélyreható ismeretére van szükség. A legújabb szekvenálási kémia, illetve szoftverek párosításával a homopolimer hibák szinte teljesen kiküszöbölhetőek, egyedül a homopolimer szekvenciák találkozása problémás, ha a homopolimer szakaszok egyenként is több, mint hat nukleotid hosszúságúak (például: AAAAAAATTTTTT), ilyen régiók azonban ritkán fordulnak elő a kódoló genomban.

Összességében az új-generációs szekvenálás korábban a klinikumban nem elérhető vizsgálatokat tett lehetővé, miközben a megbízhatósága összevethető maradt a hagyományos, Sanger-szekvenálásával.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az osteogenesis imperfecta (OI) egy örökletes, kötőszöveti megbetegedés, változatos fenotípusos megjelenéssel. A betegség elsődleges oka az I-es típusú kollagént kódoló két gén (COL1A1 és COL1A2) egyikének a hibája, mely az esetek közel 90%-ánál áll a szimptomák hátterében.

Az első leírójáról Wilson-kórnak elnevezett anyagcserebetegséget a májsejtekben kifejeződő réz transzporter ATPáz 2-t kódoló, ATP7B génnek a defektusa okozza. Ennek következtében a réz felhalmozódást mutat a májsejtekben, később a réz a keringésbe jut és más szervekben akumulálódik.

Vizsgálatunk célja egy új-generációs szekvenáláson alapuló géndiagnosztikai panel kidolgozása volt, mely egy időben képes több gén teljes kódoló szakaszait vizsgálni az osteogenesis imperfectában szenvedő betegek esetében, illetve képes a Wilson-kór tüneteire felelős ATP7B gén hibáját a gén teljes transzlálódó részén kimutatni. A két vizsgálatra két különböző technikát választottunk: az OI génpanelt szekvencia elfogáson alapuló Agilent HaloPlex módszerrel, míg az ATP7B gént multiplex PCR-t felhasználó AmpliSeq metodikával terveztük feldúsítani a DNS könyvtár készítése során. A szekvenálást Ion Torrent PGM készüléken végeztük.

Vizsgálatunkhoz hat, osteogenesis imperfectában szenvedő páciensből és hat, klinikailag Wilson-kór tüneteire mutató betegből gyűjtöttünk be perifériális vérmintákat.

OI-s betegeink esetében összesen 23 különböző variánst azonosítottunk a mintákban. A multiplex PCR technikát használó AmpliSeq könyvtárkészítés során betegenként 8-13 között változott az azonosított variánsok száma.

Az OI-s beteganyagban három új genetikai variációt azonosítottunk. Két betegünkben korábban már az irodalomban leírt heterozigóta, patogén mutációkat találtunk. Összesen kilenc, betegséget okozó mutációt találtunk a Wilson-kóros tüneteket mutató betegekben. A leggyakrabban az ATP7B p.His1069Gln eltérés fordult elő, heterozigóta formában, négy betegben.

A mutációk mindegyikét sikeresen erősítettük meg bidirekcionális Sanger-szekvenálással is, az új-generációs szekvenálás variánsai közt nem volt fals pozitív találat.

8. SUMMARY

Osteogenesis imperfecta (OI) is a hereditary connective tissue disease with diverse phenotypic appearance. The primary cause of the disease is a defect in one of the two genes encoding type I collagen (COL1A1 and COL1A2), which is responsible for nearly 90% of the symptoms.

A metabolic disorder called Wilson's disease from its first descriptor is caused by a defect in the ATP7B gene encoding copper transporter ATPase 2, which is expressed in liver cells. As a result, copper shows an accumulation in the liver cells, later the copper enters the circulation and accumulates in other organs.

The aim of our study was to develop a gene diagnostic panel based on next-generation sequencing, which can simultaneously examine the complete coding regions of several genes in patients with osteogenesis imperfecta and detect the defect of the ATP7B gene responsible for Wilson's disease in the entire translated part. Two different techniques were selected for the two assays: the OI gene panel was sequenced by Agilent HaloPlex, and the ATP7B gene was designed to be amplified by AmpliSeq using multiplex PCR to construct the DNA library. Sequencing was performed on an Ion Torrent PGM.

For our study, peripheral blood samples were collected from six patients with osteogenesis imperfecta and six patients with clinical signs of Wilson's disease.

A total of 23 different variants were identified in our patients with OI. The number of identified variants varied from 8 to 13 per patient during AmpliSeq library construction using multiplex PCR.

Three new genetic variants were identified in the OI patient material. Two of our patients have previously found heterozygous pathogenic mutations described in the literature. A total of nine disease-causing mutations were found in patients with Wilson's disease symptoms. Most frequently, heterozygous ATP7B p.His1069Gln alteration occurred in four patients.

All mutations were successfully confirmed by bidirectional Sanger sequencing, and there was no false positive variant from the next-generation sequencing data.

Our results have shown that NGS technology may provide a comprehensive high capacity tool for the diagnosis of diseases caused by multiple genetic variants in a routine clinical setup.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1]. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12): 5463-5467.
- [2]. Maxam AM, Gilbert W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(2): 560-564.
- [3]. International Human Genome Sequencing C. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011): 931-945.
- [4]. Schloss JA. (2008) How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nat Biotechnol*, 26(10): 1113-1115.
- [5]. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057): 376-380.
- [6]. Valouev A, Ichikawa J, Tonthat T, Stuart J, Ranade S, Peckham H, Zeng K, Malek JA, Costa G, McKernan K, Sidow A, Fire A, Johnson SM. (2008) A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res*, 18(7): 1051-1063.
- [7]. Pushkarev D, Neff NF, Quake SR. (2009) Single-molecule sequencing of an individual human genome. *Nat Biotechnol*, 27(9): 847-850.
- [8]. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*, 8(3): 175-185.
- [9]. Marini JC. (1988) Osteogenesis imperfecta: comprehensive management. *Adv Pediatr*, 35: 391-426.
- [10]. Palomo T, Vilaca T, Lazaretti-Castro M. (2017) Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 24(6): 381-388.
- [11]. Commission E. Non-communicable diseases

- [12]. Lim J, Grafe I, Alexander S, Lee B. (2017) Genetic causes and mechanisms of Osteogenesis Imperfecta. *Bone*, 102: 40-49.
- [13]. Van Dijk FS, Sillence DO. (2014) Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J Med Genet A*, 164A(6): 1470-1481.
- [14]. Eyre DR, Weis MA. (2013) Bone collagen: new clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta. *Calcif Tissue Int*, 93(4): 338-347.
- [15]. Canty EG, Kadler KE. (2005) Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci*, 118(Pt 7): 1341-1353.
- [16]. Eyre D. (1987) Collagen cross-linking amino acids. *Methods Enzymol*, 144: 115-139.
- [17]. Morello R, Bertin TK, Chen Y, Hicks J, Tonachini L, Monticone M, Castagnola P, Rauch F, Glorieux FH, Vranka J, Bachinger HP, Pace JM, Schwarze U, Byers PH, Weis M, Fernandes RJ, Eyre DR, Yao Z, Boyce BF, Lee B. (2006) CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell*, 127(2): 291-304.
- [18]. Hudson DM, Eyre DR. (2013) Collagen prolyl 3-hydroxylation: a major role for a minor post-translational modification? *Connect Tissue Res*, 54(4-5): 245-251.
- [19]. Cabral WA, Chang W, Barnes AM, Weis M, Scott MA, Leikin S, Makareeva E, Kuznetsova NV, Rosenbaum KN, Tiffit CJ, Bulas DI, Kozma C, Smith PA, Eyre DR, Marini JC. (2007) Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet*, 39(3): 359-365.
- [20]. van Dijk FS, Nesbitt IM, Zwikstra EH, Nikkels PG, Piersma SR, Fratantoni SA, Jimenez CR, Huizer M, Morsman AC, Cobben JM, van Roij MH, Elting MW, Verbeke JI, Wijnaendts LC, Shaw NJ, Hogler W, McKeown C, Sistermans EA, Dalton A, Meijers-Heijboer H, Pals G. (2009) PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 85(4): 521-527.
- [21]. Grafe I, Alexander S, Yang T, Lietman C, Homan EP, Munivez E, Chen Y, Jiang MM, Bertin T, Dawson B, Asuncion F, Ke HZ, Ominsky MS, Lee B. (2016) Sclerostin Antibody Treatment Improves the Bone Phenotype of *Crtap*(*-/-*) Mice, a Model of Recessive Osteogenesis Imperfecta. *J Bone Miner Res*, 31(5): 1030-1040.
- [22]. Barnes AM, Chang W, Morello R, Cabral WA, Weis M, Eyre DR, Leikin S, Makareeva E, Kuznetsova N, Uveges TE, Ashok A, Flor AW, Mulvihill JJ, Wilson PL,

Sundaram UT, Lee B, Marini JC. (2006) Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med*, 355(26): 2757-2764.

[23]. Vranka JA, Pokidysheva E, Hayashi L, Zientek K, Mizuno K, Ishikawa Y, Maddox K, Tufa S, Keene DR, Klein R, Bachinger HP. (2010) Prolyl 3-hydroxylase 1 null mice display abnormalities in fibrillar collagen-rich tissues such as tendons, skin, and bones. *J Biol Chem*, 285(22): 17253-17262.

[24]. Homan EP, Lietman C, Grafe I, Lennington J, Morello R, Napierala D, Jiang MM, Munivez EM, Dawson B, Bertin TK, Chen Y, Lua R, Lichtarge O, Hicks J, Weis MA, Eyre D, Lee BH. (2014) Differential effects of collagen prolyl 3-hydroxylation on skeletal tissues. *PLoS Genet*, 10(1): e1004121.

[25]. Choi JW, Sutor SL, Lindquist L, Evans GL, Madden BJ, Bergen HR, 3rd, Hefferan TE, Yaszemski MJ, Bram RJ. (2009) Severe osteogenesis imperfecta in cyclophilin B-deficient mice. *PLoS Genet*, 5(12): e1000750.

[26]. Baldrige D, Schwarze U, Morello R, Lennington J, Bertin TK, Pace JM, Pepin MG, Weis M, Eyre DR, Walsh J, Lambert D, Green A, Robinson H, Michelson M, Houge G, Lindman C, Martin J, Ward J, Lemyre E, Mitchell JJ, Krakow D, Rimoin DL, Cohn DH, Byers PH, Lee B. (2008) CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat*, 29(12): 1435-1442.

[27]. Cabral WA, Perdivara I, Weis M, Terajima M, Blissett AR, Chang W, Perosky JE, Makareeva EN, Mertz EL, Leikin S, Tomer KB, Kozloff KM, Eyre DR, Yamauchi M, Marini JC. (2014) Abnormal type I collagen post-translational modification and crosslinking in a cyclophilin B KO mouse model of recessive osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet*, 10(6): e1004465.

[28]. van der Slot AJ, Zuurmond AM, Bardoel AF, Wijmenga C, Pruijs HE, Sillence DO, Brinckmann J, Abraham DJ, Black CM, Verzijl N, DeGroot J, Hanemaaijer R, TeKoppele JM, Huizinga TW, Bank RA. (2003) Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. *J Biol Chem*, 278(42): 40967-40972.

[29]. Puig-Hervas MT, Temtamy S, Aglan M, Valencia M, Martinez-Glez V, Ballesta-Martinez MJ, Lopez-Gonzalez V, Ashour AM, Amr K, Pulido V, Guillen-Navarro E, Lapunzina P, Caparros-Martin JA, Ruiz-Perez VL. (2012) Mutations in PLOD2 cause autosomal-recessive connective tissue disorders within the Bruck syndrome--osteogenesis imperfecta phenotypic spectrum. *Hum Mutat*, 33(10): 1444-1449.

- [30]. Ha-Vinh R, Alanay Y, Bank RA, Campos-Xavier AB, Zankl A, Superti-Furga A, Bonafe L. (2004) Phenotypic and molecular characterization of Bruck syndrome (osteogenesis imperfecta with contractures of the large joints) caused by a recessive mutation in PLOD2. *Am J Med Genet A*, 131(2): 115-120.
- [31]. Forlino A, Marini JC. (2016) Osteogenesis imperfecta. *Lancet*, 387(10028): 1657-1671.
- [32]. Gjaltema RA, van der Stoel MM, Boersema M, Bank RA. (2016) Disentangling mechanisms involved in collagen pyridinoline cross-linking: The immunophilin FKBP65 is critical for dimerization of lysyl hydroxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(26): 7142-7147.
- [33]. Lietman CD, Rajagopal A, Homan EP, Munivez E, Jiang MM, Bertin TK, Chen Y, Hicks J, Weis M, Eyre D, Lee B, Krakow D. (2014) Connective tissue alterations in *Fkbp10^{-/-}* mice. *Hum Mol Genet*, 23(18): 4822-4831.
- [34]. Widmer C, Gebauer JM, Brunstein E, Rosenbaum S, Zaucke F, Drogemuller C, Leeb T, Baumann U. (2012) Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(33): 13243-13247.
- [35]. Duran I, Nevarez L, Sarukhanov A, Wu S, Lee K, Krejci P, Weis M, Eyre D, Krakow D, Cohn DH. (2015) HSP47 and FKBP65 cooperate in the synthesis of type I procollagen. *Hum Mol Genet*, 24(7): 1918-1928.
- [36]. Lindert U, Weis MA, Rai J, Seeliger F, Hausser I, Leeb T, Eyre D, Rohrbach M, Giunta C. (2015) Molecular Consequences of the SERPINH1/HSP47 Mutation in the Dachshund Natural Model of Osteogenesis Imperfecta. *J Biol Chem*, 290(29): 17679-17689.
- [37]. Wang M, Kaufman RJ. (2014) The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer*, 14(9): 581-597.
- [38]. Murakami T, Hino S, Nishimura R, Yoneda T, Wanaka A, Imaizumi K. (2011) Distinct mechanisms are responsible for osteopenia and growth retardation in OASIS-deficient mice. *Bone*, 48(3): 514-523.
- [39]. Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, Sekiya H, Tsumagari K, Ochiai K, Yoshinaga K, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Kou I, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A, Imaizumi K. (2009) Signalling mediated

by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol*, 11(10): 1205-1211.

[40]. Symoens S, Malfait F, D'Hondt S, Callewaert B, Dheedene A, Steyaert W, Bachinger HP, De Paepe A, Kayserili H, Coucke PJ. (2013) Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans. *Orphanet J Rare Dis*, 8: 154.

[41]. Lindert U, Cabral WA, Ausavarat S, Tongkobpetch S, Ludin K, Barnes AM, Yeetong P, Weis M, Krabichler B, Srichomthong C, Makareeva EN, Janecke AR, Leikin S, Rothlisberger B, Rohrbach M, Kennerknecht I, Eyre DR, Suphapeetiporn K, Giunta C, Marini JC, Shotelersuk V. (2016) MBTPS2 mutations cause defective regulated intramembrane proteolysis in X-linked osteogenesis imperfecta. *Nat Commun*, 7: 11920.

[42]. Venturi E, Sitsapesan R, Yamazaki D, Takeshima H. (2013) TRIC channels supporting efficient Ca(2+) release from intracellular stores. *Pflugers Arch*, 465(2): 187-195.

[43]. Zhao C, Ichimura A, Qian N, Iida T, Yamazaki D, Noma N, Asagiri M, Yamamoto K, Komazaki S, Sato C, Aoyama F, Sawaguchi A, Kakizawa S, Nishi M, Takeshima H. (2016) Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. *Sci Signal*, 9(428): ra49.

[44]. Rubinato E, Morgan A, D'Eustacchio A, Pecile V, Gortani G, Gasparini P, Faletta F. (2014) A novel deletion mutation involving TMEM38B in a patient with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Gene*, 545(2): 290-292.

[45]. Shaheen R, Alazami AM, Alshammari MJ, Faqeih E, Alhashmi N, Mousa N, Alsinani A, Ansari S, Alzahrani F, Al-Owain M, Alzayed ZS, Alkuraya FS. (2012) Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. *J Med Genet*, 49(10): 630-635.

[46]. Volodarsky M, Markus B, Cohen I, Staretz-Chacham O, Flusser H, Landau D, Shelef I, Langer Y, Birk OS. (2013) A deletion mutation in TMEM38B associated with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat*, 34(4): 582-586.

[47]. Cabral WA, Ishikawa M, Garten M, Makareeva EN, Sargent BM, Weis M, Barnes AM, Webb EA, Shaw NJ, Ala-Kokko L, Lacbawan FL, Hogler W, Leikin S, Blank PS, Zimmerberg J, Eyre DR, Yamada Y, Marini JC. (2016) Absence of the ER Cation Channel TMEM38B/TRIC-B Disrupts Intracellular Calcium Homeostasis and

Dysregulates Collagen Synthesis in Recessive Osteogenesis Imperfecta. *PLoS Genet*, 12(7): e1006156.

[48]. Kadler KE, Hojima Y, Prockop DJ. (1987) Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type I pC-collagen with procollagen C-proteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen self-assembly is a classical example of an entropy-driven process. *J Biol Chem*, 262(32): 15696-15701.

[49]. Suzuki N, Labosky PA, Furuta Y, Hargett L, Dunn R, Fogo AB, Takahara K, Peters DM, Greenspan DS, Hogan BL. (1996) Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by *Bmp1*, a mammalian gene related to *Drosophila* *tolloid*. *Development*, 122(11): 3587-3595.

[50]. Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong HH, Greenspan DS, Trackman PC. (2001) Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem*, 276(25): 22537-22543.

[51]. Muir AM, Ren Y, Butz DH, Davis NA, Blank RD, Birk DE, Lee SJ, Rowe D, Feng JQ, Greenspan DS. (2014) Induced ablation of *Bmp1* and *Tll1* produces osteogenesis imperfecta in mice. *Hum Mol Genet*, 23(12): 3085-3101.

[52]. Martinez-Glez V, Valencia M, Caparros-Martin JA, Aglan M, Temtamy S, Tenorio J, Pulido V, Lindert U, Rohrbach M, Eyre D, Giunta C, Lapunzina P, Ruiz-Perez VL. (2012) Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat*, 33(2): 343-350.

[53]. Valencia M, Caparros-Martin JA, Sirerol-Piquer MS, Garcia-Verdugo JM, Martinez-Glez V, Lapunzina P, Temtamy S, Aglan M, Lund AM, Nikkels PG, Ruiz-Perez VL, Ostergaard E. (2014) Report of a newly indentified patient with mutations in *BMP1* and underlying pathogenetic aspects. *Am J Med Genet A*, 164A(5): 1143-1150.

[54]. Vincourt JB, Etienne S, Cottet J, Delaunay C, Malanda CB, Lionneton F, Sirveaux F, Netter P, Plenat F, Mainard D, Vignaud JM, Magdalou J. (2010) C-propeptides of procollagens I alpha 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration. *Cancer Res*, 70(11): 4739-4748.

- [55]. Long F. (2011) Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(1): 27-38.
- [56]. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML, Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative G. (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107(4): 513-523.
- [57]. Babij P, Zhao W, Small C, Kharode Y, Yaworsky PJ, Bouxsein ML, Reddy PS, Bodine PV, Robinson JA, Bhat B, Marzolf J, Moran RA, Bex F. (2003) High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res*, 18(6): 960-974.
- [58]. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Noguez X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet*, 70(1): 11-19.
- [59]. Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, Fischer B, Yigit G, Janda CY, Becker J, Breer S, Altunoglu U, Grunhagen J, Krawitz P, Hecht J, Schinke T, Makareeva E, Lausch E, Cankaya T, Caparros-Martin JA, Lapunzina P, Temtamy S, Aglan M, Zabel B, Eysel P, Koerber F, Leikin S, Garcia KC, Netzer C, Schonau E, Ruiz-Perez VL, Mundlos S, Amling M, Kornak U, Marini J, Wollnik B. (2013) Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet*, 92(4): 565-574.
- [60]. Pyott SM, Tran TT, Leistritz DF, Pepin MG, Mendelsohn NJ, Temme RT, Fernandez BA, Elsayed SM, Elsobky E, Verma I, Nair S, Turner EH, Smith JD, Jarvik

- GP, Byers PH. (2013) WNT1 mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 92(4): 590-597.
- [61]. Joeng KS, Lee YC, Jiang MM, Bertin TK, Chen Y, Abraham AM, Ding H, Bi X, Ambrose CG, Lee BH. (2014) The swaying mouse as a model of osteogenesis imperfecta caused by WNT1 mutations. *Hum Mol Genet*, 23(15): 4035-4042.
- [62]. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1): 17-29.
- [63]. Baek WY, de Crombrughe B, Kim JE. (2010) Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance. *Bone*, 46(4): 920-928.
- [64]. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparros-Martin JA, Valencia M, Leton R, Martinez-Glez V, Elhossini R, Amr K, Vilaboa N, Ruiz-Perez VL. (2010) Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 87(1): 110-114.
- [65]. Homan EP, Rauch F, Grafe I, Lietman C, Doll JA, Dawson B, Bertin T, Napierala D, Morello R, Gibbs R, White L, Miki R, Cohn DH, Crawford S, Travers R, Glorieux FH, Lee B. (2011) Mutations in SERPINF1 cause osteogenesis imperfecta type VI. *J Bone Miner Res*, 26(12): 2798-2803.
- [66]. Becker J, Semler O, Gilissen C, Li Y, Bolz HJ, Giunta C, Bergmann C, Rohrbach M, Koerber F, Zimmermann K, de Vries P, Wirth B, Schoenau E, Wollnik B, Veltman JA, Hoischen A, Netzer C. (2011) Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 88(3): 362-371.
- [67]. Rajagopal A, Homan EP, Joeng KS, Suzuki M, Bertin T, Cela R, Munivez E, Dawson B, Jiang MM, Gannon F, Crawford S, Lee BH. (2016) Restoration of the serum level of SERPINF1 does not correct the bone phenotype in *Serpinf1* null mice. *Mol Genet Metab*, 117(3): 378-382.
- [68]. Belinsky GS, Sreekumar B, Andrejcsk JW, Saltzman WM, Gong J, Herzog RI, Lin S, Horsley V, Carpenter TO, Chung C. (2016) Pigment epithelium-derived factor restoration increases bone mass and improves bone plasticity in a model of osteogenesis imperfecta type VI via *Wnt3a* blockade. *FASEB J*, 30(8): 2837-2848.

- [69]. Moffatt P, Gaumont MH, Salois P, Sellin K, Bessette MC, Godin E, de Oliveira PT, Atkins GJ, Nanci A, Thomas G. (2008) Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization. *J Bone Miner Res*, 23(9): 1497-1508.
- [70]. Hanagata N, Li X, Morita H, Takemura T, Li J, Minowa T. (2011) Characterization of the osteoblast-specific transmembrane protein IFITM5 and analysis of IFITM5-deficient mice. *J Bone Miner Metab*, 29(3): 279-290.
- [71]. Cho TJ, Lee KE, Lee SK, Song SJ, Kim KJ, Jeon D, Lee G, Kim HN, Lee HR, Eom HH, Lee ZH, Kim OH, Park WY, Park SS, Ikegawa S, Yoo WJ, Choi IH, Kim JW. (2012) A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V. *Am J Hum Genet*, 91(2): 343-348.
- [72]. Semler O, Garbes L, Keupp K, Swan D, Zimmermann K, Becker J, Iden S, Wirth B, Eysel P, Koerber F, Schoenau E, Bohlander SK, Wollnik B, Netzer C. (2012) A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *Am J Hum Genet*, 91(2): 349-357.
- [73]. Lietman CD, Marom R, Munivez E, Bertin TK, Jiang MM, Chen Y, Dawson B, Weis MA, Eyre D, Lee B. (2015) A transgenic mouse model of OI type V supports a neomorphic mechanism of the IFITM5 mutation. *J Bone Miner Res*, 30(3): 489-498.
- [74]. Farber CR, Reich A, Barnes AM, Becerra P, Rauch F, Cabral WA, Bae A, Quinlan A, Glorieux FH, Clemens TL, Marini JC. (2014) A novel IFITM5 mutation in severe atypical osteogenesis imperfecta type VI impairs osteoblast production of pigment epithelium-derived factor. *J Bone Miner Res*, 29(6): 1402-1411.
- [75]. Janssens K, Gershoni-Baruch R, Guanabens N, Migone N, Ralston S, Bonduelle M, Lissens W, Van Maldergem L, Vanhoenacker F, Verbruggen L, Van Hul W. (2000) Mutations in the gene encoding the latency-associated peptide of TGF-beta 1 cause Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet*, 26(3): 273-275.
- [76]. Gentry LE, Lioubin MN, Purchio AF, Marquardt H. (1988) Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol*, 8(10): 4162-4168.
- [77]. Dallas SL, Park-Snyder S, Miyazono K, Twardzik D, Mundy GR, Bonewald LF. (1994) Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta

(TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein. *J Biol Chem*, 269(9): 6815-6821.

[78]. Massague J. (2012) TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(10): 616-630.

[79]. Hering S, Isken E, Knabbe C, Janott J, Jost C, Pommer A, Muhr G, Schatz H, Pfeiffer AF. (2001) TGFbeta1 and TGFbeta2 mRNA and protein expression in human bone samples. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109(4): 217-226.

[80]. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*, 302 (Pt 2): 527-534.

[81]. Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. (1994) Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem*, 269(51): 32634-32638.

[82]. Oreffo RO, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LF. (1989) Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 158(3): 817-823.

[83]. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, Feng X, Van Hul W, Wan M, Cao X. (2009) TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*, 15(7): 757-765.

[84]. Erlebacher A, Derynck R. (1996) Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol*, 132(1-2): 195-210.

[85]. Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R. (2001) TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J*, 20(9): 2254-2272.

[86]. Grafe I, Yang T, Alexander S, Homan EP, Lietman C, Jiang MM, Bertin T, Munivez E, Chen Y, Dawson B, Ishikawa Y, Weis MA, Sampath TK, Ambrose C, Eyre D, Bachinger HP, Lee B. (2014) Excessive transforming growth factor-beta signaling is a common mechanism in osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, 20(6): 670-675.

[87]. Rauch F, Travers R, Parfitt AM, Glorieux FH. (2000) Static and dynamic bone histomorphometry in children with osteogenesis imperfecta. *Bone*, 26(6): 581-589.

- [88]. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY, Dietz HC. (2003) Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet*, 33(3): 407-411.
- [89]. Baldrige D, Lenington J, Weis M, Homan EP, Jiang MM, Munivez E, Keene DR, Hogue WR, Pyott S, Byers PH, Krakow D, Cohn DH, Eyre DR, Lee B, Morello R. (2010) Generalized connective tissue disease in *Crtap*^{-/-} mouse. *PLoS One*, 5(5): e10560.
- [90]. Bianchi L, Gagliardi A, Maruelli S, Besio R, Landi C, Gioia R, Kozloff KM, Khoury BM, Coucke PJ, Symoens S, Marini JC, Rossi A, Bini L, Forlino A. (2015) Altered cytoskeletal organization characterized lethal but not surviving *Brtl*^{+/-} mice: insight on phenotypic variability in osteogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*, 24(21): 6118-6133.
- [91]. Wipff PJ, Hinz B. (2008) Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *Eur J Cell Biol*, 87(8-9): 601-615.
- [92]. Paterson CR, McAllion S, Stellman JL. (1984) Osteogenesis imperfecta after the menopause. *N Engl J Med*, 310(26): 1694-1696.
- [93]. Folkestad L, Hald JD, Hansen S, Gram J, Langdahl B, Abrahamsen B, Brixen K. (2012) Bone geometry, density, and microarchitecture in the distal radius and tibia in adults with osteogenesis imperfecta type I assessed by high-resolution pQCT. *J Bone Miner Res*, 27(6): 1405-1412.
- [94]. Imbert L, Auregan JC, Pernelle K, Hoc T. (2014) Mechanical and mineral properties of osteogenesis imperfecta human bones at the tissue level. *Bone*, 65: 18-24.
- [95]. Ben Amor IM, Roughley P, Glorieux FH, Rauch F. (2013) Skeletal clinical characteristics of osteogenesis imperfecta caused by haploinsufficiency mutations in *COL1A1*. *J Bone Miner Res*, 28(9): 2001-2007.
- [96]. Sillence D, Butler B, Latham M, Barlow K. (1993) Natural history of blue sclerae in osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet*, 45(2): 183-186.
- [97]. Barron MJ, McDonnell ST, Mackie I, Dixon MJ. (2008) Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*, 3: 31.
- [98]. O'Connell AC, Marini JC. (1999) Evaluation of oral problems in an osteogenesis imperfecta population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 87(2): 189-196.

- [99]. Pedersen U. (1984) Hearing loss in patients with osteogenesis imperfecta. A clinical and audiological study of 201 patients. *Scand Audiol*, 13(2): 67-74.
- [100]. McKiernan FE. (2005) Musculoskeletal manifestations of mild osteogenesis imperfecta in the adult. *Osteoporos Int*, 16(12): 1698-1702.
- [101]. Arponen H, Makitie O, Waltimo-Siren J. (2014) Association between joint hypermobility, scoliosis, and cranial base anomalies in paediatric Osteogenesis imperfecta patients: a retrospective cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disord*, 15: 428.
- [102]. Ashournia H, Johansen FT, Folkestad L, Diederichsen AC, Brixen K. (2015) Heart disease in patients with osteogenesis imperfecta - A systematic review. *Int J Cardiol*, 196: 149-157.
- [103]. Sillence DO, Senn A, Danks DM. (1979) Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet*, 16(2): 101-116.
- [104]. Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Sangiorgi L, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Superti-Furga A, Warman M, Unger S. (2015) Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2015 revision. *Am J Med Genet A*, 167A(12): 2869-2892.
- [105]. Edouard T, Glorieux FH, Rauch F. (2011) Predictors and correlates of vitamin D status in children and adolescents with osteogenesis imperfecta. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(10): 3193-3198.
- [106]. Plante L, Veilleux LN, Glorieux FH, Weiler H, Rauch F. (2016) Effect of high-dose vitamin D supplementation on bone density in youth with osteogenesis imperfecta: A randomized controlled trial. *Bone*, 86: 36-42.
- [107]. Tournis S, Dede AD. (2018) Osteogenesis imperfecta - A clinical update. *Metabolism*, 80: 27-37.
- [108]. Lin JH. (1996) Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*, 18(2): 75-85.
- [109]. Hald JD, Evangelou E, Langdahl BL, Ralston SH. (2015) Bisphosphonates for the prevention of fractures in osteogenesis imperfecta: meta-analysis of placebo-controlled trials. *J Bone Miner Res*, 30(5): 929-933.
- [110]. Trejo P, Rauch F. (2016) Osteogenesis imperfecta in children and adolescents- new developments in diagnosis and treatment. *Osteoporos Int*, 27(12): 3427-3437.

- [111]. Biggin A, Briody JN, Ormshaw E, Wong KK, Bennetts BH, Munns CF. (2014) Fracture during intravenous bisphosphonate treatment in a child with osteogenesis imperfecta: an argument for a more frequent, low-dose treatment regimen. *Horm Res Paediatr*, 81(3): 204-210.
- [112]. Sato A, Ouellet J, Muneta T, Glorieux FH, Rauch F. (2016) Scoliosis in osteogenesis imperfecta caused by COL1A1/COL1A2 mutations - genotype-phenotype correlations and effect of bisphosphonate treatment. *Bone*, 86: 53-57.
- [113]. George S, Weber DR, Kaplan P, Hummel K, Monk HM, Levine MA. (2015) Short-Term Safety of Zoledronic Acid in Young Patients With Bone Disorders: An Extensive Institutional Experience. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(11): 4163-4171.
- [114]. Henedige AA, Jayasinghe J, Khajeh J, Macfarlane TV. (2013) Systematic review on the incidence of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw in children diagnosed with osteogenesis imperfecta. *J Oral Maxillofac Res*, 4(4): e1.
- [115]. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM, Cosman F, Curtis JR, Dell R, Dempster DW, Ebeling PR, Einhorn TA, Genant HK, Geusens P, Klaushofer K, Lane JM, McKiernan F, McKinney R, Ng A, Nieves J, O'Keefe R, Papapoulos S, Howe TS, van der Meulen MC, Weinstein RS, Whyte MP. (2014) Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*, 29(1): 1-23.
- [116]. Vuorimies I, Mayranpaa MK, Valta H, Kroger H, Toiviainen-Salo S, Makitie O. (2017) Bisphosphonate Treatment and the Characteristics of Femoral Fractures in Children With Osteogenesis Imperfecta. *J Clin Endocrinol Metab*, 102(4): 1333-1339.
- [117]. Semler O, Netzer C, Hoyer-Kuhn H, Becker J, Eysel P, Schoenau E. (2012) First use of the RANKL antibody denosumab in osteogenesis imperfecta type VI. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 12(3): 183-188.
- [118]. Hoyer-Kuhn H, Franklin J, Allo G, Kron M, Netzer C, Eysel P, Hero B, Schoenau E, Semler O. (2016) Safety and efficacy of denosumab in children with osteogenesis imperfect--a first prospective trial. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 16(1): 24-32.
- [119]. Orwoll ES, Shapiro J, Veith S, Wang Y, Lapidus J, Vanek C, Reeder JL, Keaveny TM, Lee DC, Mullins MA, Nagamani SC, Lee B. (2014) Evaluation of teriparatide treatment in adults with osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest*, 124(2): 491-498.

- [120]. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, Hofbauer LC, Lau E, Lewiecki EM, Miyauchi A, Zerbini CA, Milmont CE, Chen L, Maddox J, Meisner PD, Libanati C, Grauer A. (2016) Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med*, 375(16): 1532-1543.
- [121]. Glorieux FH, Devogelaer JP, Durigova M, Goemaere S, Hemsley S, Jakob F, Junker U, Ruckle J, Seefried L, Winkle PJ. (2017) BPS804 Anti-Sclerostin Antibody in Adults With Moderate Osteogenesis Imperfecta: Results of a Randomized Phase 2a Trial. *J Bone Miner Res*, 32(7): 1496-1504.
- [122]. clinicaltrials.gov. (2017) Safety of Fresolimumab in the Treatment of Osteogenesis Imperfecta.
- [123]. Tsai JN, Uihlein AV, Lee H, Kumbhani R, Siwila-Sackman E, McKay EA, Burnett-Bowie SA, Neer RM, Leder BZ. (2013) Teriparatide and denosumab, alone or combined, in women with postmenopausal osteoporosis: the DATA study randomised trial. *Lancet*, 382(9886): 50-56.
- [124]. Compston A. (2009) Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver, by S. A. Kinnier Wilson, (From the National Hospital, and the Laboratory of the National Hospital, Queen Square, London) *Brain* 1912: 34; 295-509. *Brain*, 132(Pt 8): 1997-2001.
- [125]. Bennett J, Hahn SH. (2011) Clinical molecular diagnosis of Wilson disease. *Semin Liver Dis*, 31(3): 233-238.
- [126]. Walker JM, Huster D, Ralle M, Morgan CT, Blackburn NJ, Lutsenko S. (2004) The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's Disease Protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1. *J Biol Chem*, 279(15): 15376-15384.
- [127]. Cater MA, Forbes J, La Fontaine S, Cox D, Mercer JF. (2004) Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites. *Biochem J*, 380(Pt 3): 805-813.
- [128]. de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, van de Berghe PV, Muller P, Berger R, Gitlin JD, Wijmenga C, Klomp LW. (2007) Distinct Wilson's disease mutations in ATP7B are associated with enhanced binding to COMMD1 and reduced stability of ATP7B. *Gastroenterology*, 133(4): 1316-1326.
- [129]. Roberts EA, Schilsky ML, American Association for Study of Liver D. (2008) Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*, 47(6): 2089-2111.

- [130]. Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG. (2015) Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol*, 14(1): 103-113.
- [131]. Xu X, Pin S, Gathinji M, Fuchs R, Harris ZL. (2004) Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*, 1012: 299-305.
- [132]. Edwards CQ, Williams DM, Cartwright GE. (1979) Hereditary hypoceruloplasminemia. *Clin Genet*, 15(4): 311-316.
- [133]. Coffey AJ, Durkie M, Hague S, McLay K, Emmerson J, Lo C, Klaffke S, Joyce CJ, Dhawan A, Hadzic N, Mieli-Vergani G, Kirk R, Elizabeth Allen K, Nicholl D, Wong S, Griffiths W, Smithson S, Giffin N, Taha A, Connolly S, Gillett GT, Tanner S, Bonham J, Sharrack B, Palotie A, Rattray M, Dalton A, Bandmann O. (2013) A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain*, 136(Pt 5): 1476-1487.
- [134]. Park H, Park DK, Kim MS, Yoon JH. (2016) Pseudo-dominant inheritance in Wilson's disease. *Neurol Sci*, 37(1): 153-155.
- [135]. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. (1993) The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet*, 5(4): 327-337.
- [136]. Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, Brzustowicz LM, Cayanis E, Vitale E, Russo JJ, et al. (1993) Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet*, 5(4): 338-343.
- [137]. Lovicu M, Dessi V, Lepori MB, Zappu A, Zancan L, Giacchino R, Marazzi MG, Iorio R, Vegnente A, Vajro P, Maggiore G, Marcellini M, Barbera C, Kostic V, Farci AM, Solinas A, Altuntas B, Yuce A, Kocak N, Tsezou A, De Virgiliis S, Cao A, Loudianos G. (2006) The canine copper toxicosis gene MURR1 is not implicated in the pathogenesis of Wilson disease. *J Gastroenterol*, 41(6): 582-587.
- [138]. Dermaut B, Croes EA, Rademakers R, Van den Broeck M, Cruts M, Hofman A, van Duijn CM, Van Broeckhoven C. (2003) PRNP Val129 homozygosity increases risk for early-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 53(3): 409-412.
- [139]. Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Aguzzi A, Hock C, Nitsch RM, de Quervain DJ. (2005) The prion gene is associated with human long-term memory. *Hum Mol Genet*, 14(15): 2241-2246.

- [140]. Gourdon P, Liu XY, Skjorringe T, Morth JP, Moller LB, Pedersen BP, Nissen P. (2011) Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature*, 475(7354): 59-64.
- [141]. Sazinsky MH, Mandal AK, Arguello JM, Rosenzweig AC. (2006) Structure of the ATP binding domain from the *Archaeoglobus fulgidus* Cu⁺-ATPase. *J Biol Chem*, 281(16): 11161-11166.
- [142]. Lutsenko S, Petrukhin K, Cooper MJ, Gilliam CT, Kaplan JH. (1997) N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease proteins) bind copper selectively in vivo and in vitro with stoichiometry of one copper per metal-binding repeat. *J Biol Chem*, 272(30): 18939-18944.
- [143]. Huster D, Kuhne A, Bhattacharjee A, Raines L, Jantsch V, Noe J, Schirrmeyer W, Sommerer I, Sabri O, Berr F, Mossner J, Stieger B, Caca K, Lutsenko S. (2012) Diverse functional properties of Wilson disease ATP7B variants. *Gastroenterology*, 142(4): 947-956 e945.
- [144]. Huster D, Hoppert M, Lutsenko S, Zinke J, Lehmann C, Mossner J, Berr F, Caca K. (2003) Defective cellular localization of mutant ATP7B in Wilson's disease patients and hepatoma cell lines. *Gastroenterology*, 124(2): 335-345.
- [145]. Fanni D, Pilloni L, Orru S, Coni P, Liguori C, Serra S, Lai ML, Uccheddu A, Contu L, Van Eyken P, Faa G. (2005) Expression of ATP7B in normal human liver. *Eur J Histochem*, 49(4): 371-378.
- [146]. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN. (2014) The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet*, 133(1): 1-9.
- [147]. Usta J, Wehbeh A, Rida K, El-Rifai O, Estiphan TA, Majarian T, Barada K. (2014) Phenotype-genotype correlation in Wilson disease in a large Lebanese family: association of c.2299insC with hepatic and of p. Ala1003Thr with neurologic phenotype. *PLoS One*, 9(11): e109727.
- [148]. Park S, Park JY, Kim GH, Choi JH, Kim KM, Kim JB, Yoo HW. (2007) Identification of novel ATP7B gene mutations and their functional roles in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat*, 28(11): 1108-1113.

- [149]. Rodriguez-Granillo A, Sedlak E, Wittung-Stafshede P. (2008) Stability and ATP binding of the nucleotide-binding domain of the Wilson disease protein: effect of the common H1069Q mutation. *J Mol Biol*, 383(5): 1097-1111.
- [150]. Dmitriev OY, Bhattacharjee A, Nokhrin S, Uhlemann EM, Lutsenko S. (2011) Difference in stability of the N-domain underlies distinct intracellular properties of the E1064A and H1069Q mutants of copper-transporting ATPase ATP7B. *J Biol Chem*, 286(18): 16355-16362.
- [151]. Okada T, Shiono Y, Kaneko Y, Miwa K, Hasatani K, Hayashi Y, Mibayashi H, Aoyagi H, Tsuji S, Yoshimitsu M, Hayashi H, Yamagishi M. (2010) High prevalence of fulminant hepatic failure among patients with mutant alleles for truncation of ATP7B in Wilson's disease. *Scand J Gastroenterol*, 45(10): 1232-1237.
- [152]. Mendell JT, Sharifi NA, Meyers JL, Martinez-Murillo F, Dietz HC. (2004) Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet*, 36(10): 1073-1078.
- [153]. Panagiotakaki E, Tzetis M, Manolaki N, Loudianos G, Papatheodorou A, Manesis E, Nousia-Arvanitakis S, Syriopoulou V, Kanavakis E. (2004) Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *Am J Med Genet A*, 131(2): 168-173.
- [154]. Leggio L, Addolorato G, Loudianos G, Abenavoli L, Gasbarrini G. (2006) Genotype-phenotype correlation of the Wilson disease ATP7B gene. *Am J Med Genet A*, 140(8): 933.
- [155]. Merle U, Weiss KH, Eisenbach C, Tuma S, Ferenci P, Stremmel W. (2010) Truncating mutations in the Wilson disease gene ATP7B are associated with very low serum ceruloplasmin oxidase activity and an early onset of Wilson disease. *BMC Gastroenterol*, 10: 8.
- [156]. Yoo HW. (2002) Identification of novel mutations and the three most common mutations in the human ATP7B gene of Korean patients with Wilson disease. *Genet Med*, 4(6 Suppl): 43S-48S.
- [157]. Kalita J, Somarajan BI, Misra UK, Mittal B. (2010) R778L, H1069Q, and I1102T mutation study in neurologic Wilson disease. *Neurol India*, 58(4): 627-630.
- [158]. Folhoffer A, Ferenci P, Csak T, Horvath A, Hegedus D, Firneisz G, Osztoivits J, Kosa JP, Willheim-Polli C, Szonyi L, Abonyi M, Lakatos PL, Szalay F. (2007) Novel

mutations of the ATP7B gene among 109 Hungarian patients with Wilson's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 19(2): 105-111.

[159]. Gupta A, Bhattacharjee A, Dmitriev OY, Nokhrin S, Braiterman L, Hubbard AL, Lutsenko S. (2011) Cellular copper levels determine the phenotype of the Arg875 variant of ATP7B/Wilson disease protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(13): 5390-5395.

[160]. Ralle M, Huster D, Vogt S, Schirrmeister W, Burkhead JL, Capps TR, Gray L, Lai B, Maryon E, Lutsenko S. (2010) Wilson disease at a single cell level: intracellular copper trafficking activates compartment-specific responses in hepatocytes. *J Biol Chem*, 285(40): 30875-30883.

[161]. Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, Bochow B, Rodo M, Tarnacka B, Litwin T, Chabik G, Czlonkowska A. (2005) Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. *Clin Genet*, 68(6): 524-532.

[162]. Weiss KH, Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Fullekrug J, Stremmel W. (2006) Copper toxicosis gene MURR1 is not changed in Wilson disease patients with normal blood ceruloplasmin levels. *World J Gastroenterol*, 12(14): 2239-2242.

[163]. Simon I, Schaefer M, Reichert J, Stremmel W. (2008) Analysis of the human Atox 1 homologue in Wilson patients. *World J Gastroenterol*, 14(15): 2383-2387.

[164]. Weiss KH, Runz H, Noe B, Gotthardt DN, Merle U, Ferenci P, Stremmel W, Fullekrug J. (2010) Genetic analysis of BIRC4/XIAP as a putative modifier gene of Wilson disease. *J Inherit Metab Dis*, 33 Suppl 3: S233-240.

[165]. Przybylkowski A, Gromadzka G, Czlonkowska A. (2014) Polymorphisms of metal transporter genes DMT1 and ATP7A in Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol*, 28(1): 8-12.

[166]. Czlonkowska A, Gromadzka G, Chabik G. (2009) Monozygotic female twins discordant for phenotype of Wilson's disease. *Mov Disord*, 24(7): 1066-1069.

[167]. Schilsky ML. (2017) Wilson Disease: Diagnosis, Treatment, and Follow-up. *Clin Liver Dis*, 21(4): 755-767.

[168]. Zimbrea PC, Schilsky ML. (2014) Psychiatric aspects of Wilson disease: a review. *Gen Hosp Psychiatry*, 36(1): 53-62.

- [169]. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb I, Schilsky M, Cox D, Berr F. (2003) Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int*, 23(3): 139-142.
- [170]. European Association for Study of L. (2012) EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol*, 56(3): 671-685.
- [171]. Caprai S, Loudianos G, Massei F, Gori L, Lovicu M, Maggiore G. (2006) Direct diagnosis of Wilson disease by molecular genetics. *J Pediatr*, 148(1): 138-140.
- [172]. Shimizu N, Nakazono H, Takeshita Y, Ikeda C, Fujii H, Watanabe A, Yamaguchi Y, Hemmi H, Shimatake H, Aoki T. (1999) Molecular analysis and diagnosis in Japanese patients with Wilson's disease. *Pediatr Int*, 41(4): 409-413.
- [173]. Nakayama K, Kubota M, Katoh Y, Sawada Y, Saito A, Nishimura K, Katsura E, Ichihara N, Suzuki T, Kouguchi H, Tamura M, Honma H, Kanzaki S, Itami H, Ohtake A, Kobayashi K, Ariga T, Fujieda K, Shimizu N, Aoki T. (2008) Early and presymptomatic detection of Wilson's disease at the mandatory 3-year-old medical health care examination in Hokkaido Prefecture with the use of a novel automated urinary ceruloplasmin assay. *Mol Genet Metab*, 94(3): 363-367.
- [174]. Kumar N, Gross JB, Jr., Ahlskog JE. (2003) Myelopathy due to copper deficiency. *Neurology*, 61(2): 273-274.
- [175]. Ferenci P. (2005) Wilson's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 3(8): 726-733.
- [176]. Shim JO, Yang HR, Moon JS, Chang JY, Ko JS, Park SS, Seo JK. (2018) Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Analysis Subsequent to Direct DNA Full Sequencing for Identifying ATP7B Mutations and Phenotype Correlations in Children with Wilson Disease. *J Korean Med Sci*, 33(26): e177.
- [177]. Weiss KH, Stremmel W. (2012) Evolving perspectives in Wilson disease: diagnosis, treatment and monitoring. *Curr Gastroenterol Rep*, 14(1): 1-7.
- [178]. Weiss KH, Thurik F, Gotthardt DN, Schafer M, Teufel U, Wiegand F, Merle U, Ferenci-Foerster D, Maieron A, Stauber R, Zoller H, Schmidt HH, Reuner U, Hefter H, Trocetto JM, Houwen RH, Ferenci P, Stremmel W, Consortium E. (2013) Efficacy and safety of oral chelators in treatment of patients with Wilson disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11(8): 1028-1035 e1021-1022.

- [179]. Brewer GJ, Askari F, Dick RB, Sitterly J, Fink JK, Carlson M, Kluin KJ, Lorincz MT. (2009) Treatment of Wilson's disease with tetrathiomolybdate: V. Control of free copper by tetrathiomolybdate and a comparison with trientine. *Transl Res*, 154(2): 70-77.
- [180]. Vierstraete A. Next Generation Sequencing, <http://users.ugent.be/~avierstr/nextgen/nextgen.html>; Accessed: 29.10.2018.
- [181]. Chang F, Liu GL, Liu CJ, Li MM. Chapter 18 - Somatic Diseases (Cancer): Amplification-Based Next-Generation Sequencing. In: Kulkarni S, Pfeifer J (szerk.), *Clinical Genomics*. Academic Press, Washington, 2015: 297-319.
- [182]. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E, Working Group of the American College of Medical G, Genomics Laboratory Quality Assurance C. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*, 15(9): 733-747.
- [183]. Wang J, Ren X, Bai X, Zhang T, Wang Y, Li K, Li G. (2015) Identification of gene mutation in patients with osteogenesis imperfect using high resolution melting analysis. *Sci Rep*, 5: 13468.
- [184]. Sule G, Campeau PM, Zhang VW, Nagamani SC, Dawson BC, Grover M, Bacino CA, Sutton VR, Brunetti-Pierri N, Lu JT, Lemire E, Gibbs RA, Cohn DH, Cui H, Wong LJ, Lee BH. (2013) Next-generation sequencing for disorders of low and high bone mineral density. *Osteoporos Int*, 24(8): 2253-2259.
- [185]. van Dijk FS, Byers PH, Dalglish R, Malfait F, Maugeri A, Rohrbach M, Symoens S, Sistermans EA, Pals G. (2012) EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet*, 20(1): 11-19.
- [186]. Marlowe A, Pepin MG, Byers PH. (2002) Testing for osteogenesis imperfecta in cases of suspected non-accidental injury. *J Med Genet*, 39(6): 382-386.
- [187]. Nanji MS, Nguyen VT, Kawasoe JH, Inui K, Endo F, Nakajima T, Anezaki T, Cox DW. (1997) Haplotype and mutation analysis in Japanese patients with Wilson disease. *Am J Hum Genet*, 60(6): 1423-1429.
- [188]. Cheng N, Wang H, Wu W, Yang R, Liu L, Han Y, Guo L, Hu J, Xu L, Zhao J, Han Y, Liu Q, Li K, Wang X, Chen W. (2017) Spectrum of ATP7B mutations and genotype-phenotype correlation in large-scale Chinese patients with Wilson Disease. *Clin Genet*, 92(1): 69-79.

[189]. Grubenbecher S, Stuve O, Hefter H, Korth C. (2006) Prion protein gene codon 129 modulates clinical course of neurological Wilson disease. *Neuroreport*, 17(5): 549-552.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

(Össz-impakt faktor: 23,251, ebből a disszertációhoz közvetlenül kapcsolódó: 6,122)

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Árvai Kristóf, Horváth Péter, Balla Bernadett, Tobiás Bálint, Kató Karina, Kirschner Gyöngyi, Klujber Valéria, Lakatos Péter, Kósa János Pál: *Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice*. Sci Rep. 2016 Jun 23;6:28417. doi: 10.1038/srep28417
IF: 4,259

Németh Dániel, Árvai Kristóf, Horváth Péter, Kósa János Pál, Tobiás Bálint, Balla Bernadett, Folhoffer Anikó, Krolopp Anna, Lakatos Péter, Szalay Ferenc: *Clinical Use of Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Wilson's Disease*, Gastroenterology Research and Practice, vol. 2016, Article ID 4548039, 6 pages, 2016. doi:10.1155/2016/4548039
IF: 1,863

Árvai Kristóf, Dr. Kósa János, Dr. Horváth Péter, Dr. Balla Bernadett, Dr. Tobiás Bálint, Dr. Takács István, Dr. Nagy Zsolt, Dr. Lakatos Péter: *Osteogenesis Imperfecta rutin genetikai diagnosztikája új generációs szekvenálási (NGS) technológiával*
Magy Belorv Arch 2013; 66:
IF: --

A disszertációtól független publikációk:

Helga Barti-Juhász, András Pazsitka, Balázs Jóri, Kristóf Árvai, Dániel Erös, György Kéri, István Peták, Rudolf Mihalik: *Altered Expression of a Broad Range of Protease Genes in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells after Bortezomib Treatment* Roche Cancer Research Application Note No. 2 2009.
IF: --

Árvai Kristóf, Nagy Katalin, Barti-Juhász Helga, Peták István, Krenács Tibor, Micsik Tamás, Végső György, Perner Ferenc, Szende Béla: *Molecular profiling of parathyroid hyperplasia, adenoma and carcinoma*. Pathol Oncol Res. 2012 Jul;18(3):607-14. doi: 10.1007/s12253-011-9483-7.

IF: 1,555

Balla Bernadett, Árvai Kristóf, Horváth Péter, Tobiás Bálint, Takács István, Nagy Zsolt, Dank Magdolna, Fekete György, Kósa János Pál, Lakatos Péter: *Fast and Robust Next-Generation Sequencing Technique Using Ion Torrent Personal Genome Machine for the Screening of Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Gene*. J Mol Neurosci. 2014 Jun;53(2):204-10. doi: 10.1007/s12031-014-0286-7.

IF: 2,343

Árvai Kristóf, Horváth Péter, Balla Bernadett, Tőkés Annamária, Tobiás Bálint, Takács István, Nagy Zsolt, Lakatos Péter, Kósa János Pál: *Rapid and cost effective screening of breast and ovarian cancer genes using novel sequence capture method in clinical samples*. Fam Cancer. 2014 May 23.

IF: 1,977

Balla Bernadett, Tobiás Bálint, Kósa János Pál, Podani János, Horváth Péter, Nagy Zsolt, Horányi János, Járay Balázs, Székely Eszter, Krenács László, Árvai Kristóf, Dank Magdolna, Putz Zsuzsanna, Szabó Bence, Szili Balázs, Valkusz Zsuzsa, Vasas Béla, Györi Gabriella, Lakatos Péter, Takács István: *Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer*. J Endocrinol Invest. 2014 Sep 9.

IF: 1,994

Donáth Judit, Speer Gábor, Kósa János Pál, Árvai Kristóf, Balla Bernadett, Juhász Péter, Lakatos Péter, Poór Gyula: *Polymorphisms of CSF1 and TM7SF4 genes in a case of mild juvenile Paget's disease found using next-generation sequencing*. Croat Med J. 2015 Apr 20;56(2):145-51.

IF: 1,483

Tobiás Bálint, Halászlaki Csaba, Balla Bernadett, Kósa János Pál, Árvai Kristóf, Horváth Péter, Takács István, Nagy Zsolt, Horváth Emese, Horányi János, Járay Balázs, Székely Eszter, Székely Tamás, Győri Gabriella, Putz Zsuzsanna, Dank Magdolna, Valkusz Zsuzsa, Vasas Béla, Iványi Béla, Lakatos Péter: *Genetic Alterations in Hungarian Patients with Papillary Thyroid Cancer*. Pathol Oncol Res. 2016 Jan;22(1):27-33. doi: 10.1007/s12253-015-9969-9.

IF: 1,736

Kirschner Gyöngyi, Balla Bernadett, Horváth Péter, Kövesdi Aandrea, Lakatos Gergely, Takács István, Nagy Zsolt, Tóbiás Bálint, Árvai Kristóf, Kósa János Pál, Lakatos Péter: *Effects of imatinib and nilotinib on the whole transcriptome of cultured murine osteoblasts*. Mol Med Rep. 2016 Sep;14(3):2025-37. doi: 10.3892/mmr.2016.5459

IF: 1,692

Balla Bernadett, Sárvári Miklós, Kósa János Pál, Kocsis-Deák Barbara, Tobiás Bálint, Árvai Kristóf, Takács István, Podani János, Liposits Zsolt, Lakatos Péter: *Long-term selective estrogen receptor-beta agonist treatment modulates gene expression in bone and bone marrow of ovariectomized rats*. J Steroid Biochem Mol Biol. 2019 Apr;188:185-194. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.01.012.

IF: 3.785

Kocsis-Deák Barbara, dr. Balla Bernadett, Árvai Kristóf, dr. Tobiás Bálint, dr. Győri Gabriella, dr. Járay Balázs, dr. Székely Eszter, Podani János, dr. Kósa János, dr. Lakatos Péter: *A pajzsmirigyöbök genetikai vizsgálata újgenerációs szekvenáláson alapuló platformon kifejlesztett génpanel segítségével*. Orvosi Hetilap, 2019 Sep;160(36):1417-1425. doi: 10.1556/650.2019.31492.

IF: 0.564

Kósa János, Balla Bernadett, Kocsis-Deák Barbara, Árvai Kristóf, Tobiás Bálint, Takács István, Lakatos Péter: *Tumordiagnosztika vérből – a folyadékbiopszia* Magyar Tudomány 180:5pp. 679-685., 7 p. (2019)

IF: -

Balla Bernadett, Kocsis-Deák Barbara, Kósa János, Árvai Kristóf, Tobiás Bálint, Takács István, Lakatos Péter: *Az újgenerációs molekuláris diagnosztikai módszerek lehetőségei az endokrinológiában* Magyar Tudomány 180:5pp. 656-668., 13 p. (2019)
IF: -

Kirschner Gyöngyi, Balla Bernadett, Kósa János, Horváth Péter, Kövesdi Andrea, Lakatos Gergely, Takács István, Nagy Zsolt, Tobiás Bálint, Árvai Kristóf, Lakatos Péter: *Az onkohematológiai betegségek kezelésében használt tirozinkináz-gátló imatinib és nilotinib csonthatásainak irodalmi áttekintése és a saját kutatási eredmények bemutatása* Orvosi Hetilap 157:36 pp. 1429-1437.,9 p. (2016)
IF: -

Kocsis-Deák Barbara, Balla Berndett, Tobiás Bálint, Árvai Kristóf, Putz Zsuzsa, Kósa János Pál, Lakatos Péter: *Molekuláris genetikai vizsgálatok a pajzsmirigy daganatok diagnosztikájában.* Orvostovábbképző Szemle XXV:9 pp.49-53.,5 p. (2018)
IF: -

Lakatos Péter, Tóbiás Bálint, Kósa János, Halászlaki Csaba, Balla Bernadett, Árvai Kristóf, Kirschner Gyöngyi, Putz Zsuzsa, Dank Magdolna, Takács István: *Differenciált pajzsmirigyrákok molekuláris diagnosztikája: Hol tartunk 2016-ban?* Magyar Belorvosi Archivum 69:2 pp. 98-103.,6 p. (2016)
IF: -

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Lakatos Péternek, hogy éveken át irányította és segítette kutatómunkámat a molekuláris genetika területén, valamint, hogy lehetővé tette sikeres doktori munkám feltételeit. Szakmai útmutatásán túl tanácsai, kritikai megjegyzései is segítettek a dolgozat elkészítésében.

Szeretném megköszönni a sok segítséget és támogatást a Semmelweis Egyetem 1. számú Belgyógyászati Klinika, illetve a PentaCore Laboratórium csapatának, mindenekelőtt dr. Kósa Jánosnak. Külön köszönet illeti dr. Balla Bernadettet a disszertáció-, illetve a publikációk megírásában nyújtott el nem fogyó segítségéért, ötleteiért. Köszönöm a laboratóriumi munkában nyújtott segítséget Molnárné Kocsis-Deák Barbarának, Illés Anettnek, dr. Tóbiás Bálintnak, dr. Horváth Péternek, dr. Németh Dánielnek és Kövesdi Andreának. Sokat tanultam a genetikai tanácsadás fortélyairól dr. Klujber Valériától. Köszönöm Keresztényi Györgyi és Máté Edit gyakorlati segítségét.

Köszönöm a betegeknek a támogató együttműködést.

Végül, de nem utolsósorban szüleimnek és testvéremnek tartozom hálával a szeretetükért, támogatásukért. Köszönöm feleségem és fiam segítségét, akik az otthon melegét biztosították, melyből bármikor erőt meríthettem.