

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: Prof. Dr. Lakatos Péter, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Reismann Péter, PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Karcagi Veronika, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Mócsai Attila, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Werling Klára, PhD, egyetemi docens

Dr. ifj. Kiss Csaba, PhD, főorvos

Budapest  
2019



## **1 BEVEZETÉS**

Az 1970-es években Sanger és kutatótársai kifejlesztették a fragmentáción és lánctermináción alapuló DNS szekvenálási technikát. 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 Humán Genom Project hatalmas anyagi, időbeli és emberi ráfordítást igényelt, a történelem legnagyobb szabású biológiai-orvosi együttműködését és 3 milliárd dollárt felemészltve. Ez egyértelművé tette, hogy valamilyen új technológiára van szükség a DNS szekvencia megállapítására, mely nagyságrendekkel gyorsabb és olcsóbb is egyben. 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. 2010-ben jelent meg az Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) nevű szekvenátora. 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 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. 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.

## **2 CÉLKITŰZÉS**

Az osteogenesis imperfecta ritka öröklődő betegség, amely elsősorban a csontrendszer működészavarát okozza. A betegség a tünetek széles skálájával jelentkezhethet, ilyenek a

3

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 háttérben esetlegesen gyermekbántalmazás áll-e. 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 létrejötté 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 bekövetkezhet. 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** hátterében megbúvó gének **gyors, nagy biztonságú, költséghatékony diagnosztikai vizsgálati módszerét dolgozzuk ki**, új-generációs szekvenálási technika felhasználásával. Ennek az új technológiának a nagyságrendekkel nagyobb átteresztőképességét alkalmazva a páciens, illetve a klinikus sokkal hamarabb juthat egyértelmű diagnózishoz, mely különösen a Wilson-kór esetében azonnali terápia 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**

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. 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.

A Wilson-kór genetikai diagnosztikájához az ATP7B gén mind a 21 kódoló exonja mellett néhány távolabbi, intronikus régiót is figyelembe vettünk a tervezés során. A PRNP gén egy polimorfizmusáról ismert, hogy hatással lehet a Wilson-kórban

6

tapasztható neurológiai tünetek súlyosságára, ezért ezt a gént is belevettük a vizsgálatba.

### **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.

### **3.3 DNS Izolálása**

A begyűjtött perifériás vérmintákból genomiális DNS-t izoláltunk Reliaprep Blood gDNA Miniprep System (Promega, Fitchburg, WI, USA) kit segítségével.

### **3.4 Agilent Haloplex Könyvtár Készítés**

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.

### **3.5 Ampliseq Könyvtár Készítés**

A genomiális DNS-ből multiplex PCR segítségével felsokszorozzuk a vizsgálni kívánt régiókat, a kapott amplitonokat részlegesen visszaemésztjük, majd bárkódolt



szekvenáló adaptereket ligálunk hozzájuk, Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) kit segítségével.

### **3.6 Új-Generációs Szekvenálás Ion Torrent PGM Készüléken**

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 milliószorosán párhuzamosítva mehetnek végbe. Vizsgálataink során Ion 314 (várható áteresztőképesség 500 000 leolvasott szekvencia) és 316 (várható áteresztőképesség 3 000 000 leolvasott szekvencia) v2 BC chipet használtunk. Egy chipen lévő wellbe egy szekvenáló gyöngy kerülhet be. A wellben egy ion szenzor található, mely a DNS komplementer szálának szintézise során, az összekapcsolódó nukleotidokból felszabaduló H<sup>+</sup> által okozott pH, illetve feszültségváltozást képes detektálni. 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

8

sorrendjéről. A reakció után a készülék mosó pufferral átmosa a chip felszínét és eltávolítja a maradék nukleotidokat, a következő típusú nukleotid érkezése előtt.

### **3.7 Bioinformatikai Elemzés**

A DAT fájlokban összegyűjtött nyers feszültségértékeket egy platformspecifikus algoritmus feldolgozza és átfordítja a flow order alapján bázisokra. A base calling során kapott szekvenciákat a Torrent Suite szoftver BAM fájlokban gyűjti ki, bárkódok szerint leválogatva. Ezt követi a leolvasások referencia genomhoz való illesztése. Az illesztett szekvenciákban van lehetőség a referenciától való eltérések keresésére, a variánsok kivonatolására. 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.

## **4 EREDMÉNYEK**

### **4.1 Páciens Adatok**

Az osteogenesis imperfecta vizsgálatába hat beteget vontunk be. Négy nő- és két férfibeteg 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

9

rendelkezésünkre állt, ott felhasználtuk a betegek csontsűrűség-, szemészeti- és hallásvizsgálati adatait, illetve a családi anamnézist is. Az OI-s betegek adatait az alábbi táblázat foglalja össze:

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

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

A csontsűrűség (Bone mineral density (BMD)) mérése a lumbális gerinci szakaszon történt, kettős energiájú röntgen abszorpciometriásan. (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.

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 rézanyagcserével kapcsolatos klinikai vizsgálatok eredményei is. Hemolítikus anémia nem fordult elő a betegeink körében. A betegek adatait a következő táblázat foglalja össze:

	Nem	Első tünet (év)	KFR	Neu	Vizelet réz	Cerul. (g/L)	WD score	Fenot.	ATP7B genotípus
P1	Nő	12	Igen	Nem	++	0,18	6	T	p.M769fs/ p.H1069Q
P2	Férfi	17	Nem	Igen	+	0,05	6	N1	p.A1063V/ p.H1069Q
P3	Férfi	8	Igen	Nem	++	0,06	8	H2	p.G1351X/ p.H1069Q
P4	Férfi	17	Igen	Nem	+	0,03	5	H2	p.A1135fs/ p.L1305P
P5	Férfi	44	Nem	Nem	++	0,08	4	H1	p.A1270I/ c.1707+2dupT
P6	Férfi	14	Igen	Igen	NA	0,04	7	N2	p.R969Q/ p.H1069Q

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

májjelégtelenséggel együtt; N2: csak neurológiai tünetek. A nemzetközi score rendszer szerint a, 4 vagy magasabb score esetén a Wilson-kór diagnózisa nagyon valószínű. Hemolitikus anémia egyik betegnél sem volt megfigyelhető. A hármas számú páciensből májbiopszia is készült mely Rhodanine festésre pozitív eredményt adott.

## **4.2 A Szekvenálási Adatok Minőségi Ellenőrzése**

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 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. Az azonosított variánsok száma betegenként 8-13 között változott, természetesen ezek többsége klinikai hatás nélküli polimorfizmus volt.

### **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 transláció korai megállítását 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.

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.

#### **4.4 Wilson-Kórral Diagnosztizált Beteganyagban 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: 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.



## 5 KÖVETKEZTETÉSEK

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 pozitívitás 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  $\alpha$ -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.

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 szekvenálás hasonló ideig tart. A platformspecifikus bioinformatikai algoritmusgyűjteményhez illesztett grafikus felület könnyen kezelhető és jól testreszabható. A variánshívás teljesen paramétrezhető, ehhez azonban a platform mélyreható ismeretére van szükség. A legújabb szekvenálási kémia, illetve szoftverek párosításával a homopolimer hibák szinte teljesen kiküszöbölhetőek

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

## 6 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

1. **Árvai K**, Horváth P, Balla B, Tobiás B, Kató Karina, Kirschner Gy, Klujber V, Lakatos P, Kósa JP: Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice. *Sci Rep*. 2016 Jun 23;6:28417.  
IF: 4,259
2. Németh D, **Árvai K**, Horváth P, Kósa JP, Tobiás B, Balla B, Folhoffer A, Krolopp A, Lakatos P, 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.  
IF: 1,863
3. **Árvai K**, Dr. Kósa J, Dr. Horváth P, Dr. Balla B, Dr. Tobiás B, Dr. Takács I, Dr. Nagy Zs, Dr. Lakatos P: Osteogenesis Imperfecta rutin genetikai diagnosztikája új generációs szekvenálási (NGS) technológiával. *Magy Belorv Arch* 2013; 66:  
IF: --

### A disszertációtól független publikációk:

1. H Barti-Juhász, A Pazsitka, B Jóri, **K Árvai**, D Erős, Gy Kéri, I Peták, R 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: --
2. **Árvai K**, Nagy K, Barti-Juhász H Peták I, Krenács T, Micsik T, Végső Gy, Perner F, Szende B: Molecular profiling of parathyroid hyperplasia, adenoma and carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2012 Jul;18(3):607-14.  
IF: 1,555
3. Balla B, **Árvai K**, Horváth P, Tobiás B, Takács I, Nagy Zs, Dank M, Fekete Gy, Kósa J P, Lakatos P: 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.  
IF: 2,343
4. **Árvai K**, Horváth P, Balla B, Tökés A, Tobiás B, Takács I, Nagy Zs, Lakatos P, Kósa J P: 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
5. Balla B, Tobiás B, Kósa J P, Podani J, Horváth P, Nagy Zs, Horányi J, Járny B, Székely E, Krenács L, **Árvai K**, Dank M, Putz Zs, Szabó B, Szili B, Valkusz Zs, Vasas B, Győri G, Lakatos P, Takács I: 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
6. Donáth J, Speer G, Kósa J P, **Árvai K**, Balla B, Juhász P, Lakatos P, Poór Gy: 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
7. Tobiás B, Halászlaki Cs, Balla B, Kósa J P, **Árvai K**, Horváth P, Takács I, Nagy Zs, Horváth E, Horányi J, Járay B, Székely E, Székely T, Győri G, Putz Zs, Dank M, Valkusz Zs, Vasas B, Iványi B, Lakatos P: Genetic Alterations in Hungarian Patients with Papillary Thyroid Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2016 Jan;22(1):27-33.  
IF: 1,736
  8. Kirschner Gy, Balla B, Horváth P, Kövesdi A, Lakatos G, Takács I, Nagy Zs, Tóbiás B, **Árvai K**, Kósa J P, Lakatos P: Effects of imatinib and nilotinib on the whole transcriptome of cultured murine osteoblasts. *Mol Med Rep.* 2016 Sep;14(3):2025-37.  
IF: 1,692
  9. Balla B, Sárvári M, Kósa J P, Kocsis-Deák B, Tobiás B, **Árvai K**, Takács I, Podani J, Liposits Zs, Lakatos P: 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.  
IF: 3.785
  10. Kocsis-Deák B, dr. Balla B, **Árvai K**, dr. Tobiás B, dr. Győri G, dr. Járay B, dr. Székely E, Podani J, dr. Kósa J, dr. Lakatos P: A pajzsmirigyöbök genetikai vizsgálata újgenerációs szekvenáláson alapuló platformon kifejlesztett génpanel segítségével. *Orvosi Hetilap*, 2019 Sep;160(36):1417-1425.  
IF: 0.564