

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE**



**Diagnostika spoločensky  
závažných ochorení na Slovensku  
založená na moderných  
biotechnológiách**

**ITMS: 26240220058**





- **Druh projektu:**  
projekt v rámci Transferu technológií
- **Zodpovedný riešiteľ projektu a názov príslušnej fakulty:**  
doc. RNDr. Ľudevít Kadáši, DrSc.  
Prírodovedecká fakulta UK

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





## Štruktúra projektu

- Špecifický cieľ 1.
- Vývoj efektívnych diagnostických postupov závažných dedične podmienených ochorení (ÚMFG SAV, UK v Bratislave)
  - Aktivita 1.1. Molekulárne-genetická analýza spoločensky závažných ochorení
  - Aktivita 1.2. Vypracovanie a overenie efektívneho diagnostického postupu
- Špecifický cieľ 2.
- Vývoj diferenciálnej diagnostiky závažných herpetických infekcií ľudí (VÚ SAV)
- Špecifický cieľ 3.
- Nové diagnostické prístupy u pacientov s nádorovým ochorením a diagnózou AIDS (ÚEO SAV)
- Špecifický cieľ 4.
- Multimodálny molekulárno-diagnostický postup na charakterizáciu pacientov s reumatoidnou artritídou (MMC SAV)

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





## Aktivita 1.1. Molekulárne-genetická analýza spoločensky závažných ochorení

V rámci aktivity sa budú analyzovať nasledovné závažné dedičné ochorenia:

- cystická fibróza
- fenylketonúria
- Wilsonova choroba
- neurofibromatóza typ I

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





## Cystická fibróza

- závažné ochorenie postihujúce respiračný, tráviaci a urogenitálny trakt
- výrazne skracuje život (priemerný vek dožitia okolo 35 rokov)
- incidencia 1 : 2500 – 3000 v kaukazoidných populáciách
- zodpovedný gén: *CFTR*
  - lokalizácia 7q31
  - veľkosť : viac ako 250 kb
  - počet exónov: 27
  - kauzatívne mutácie: doteraz popísaných viac ako 1600
    - Výrazné rozdiely v škále medzi populáciami
    - Rozdielna závažnosť ochorenia podľa typu mutácií
- znalosť mutačnej škály v danej populácii je esenciálne pre efektívnu diagnostiku a prognózu priebehu ochorenia
  - pre slovenskú populáciu zatiaľ chýbajú tieto údaje

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





## Fenylketonúria

- porucha metabolizmu fenylalanínu
  - bez preventívneho zásahu ťažká mentálna retardácia u postihnutých
- incidencia 1 : 8 – 10 000 (u slovenských Rómov 1 : 1 000)
- zodpovedný gén: *PAH*
  - lokalizácia: 12q22-q24.1
  - veľkosť: 90 kb
  - počet exónov: 13
  - kauzatívne mutácie: doteraz popísaných viac ako 500
    - výrazné rozdiely v škále medzi populáciami
    - rozdielna závažnosť ochorenia podľa typu mutácií
- znalosť mutačnej škály v danej populácii je esenciálne pre efektívnu diagnostiku a prognózu priebehu ochorenia
  - pre slovenskú populáciu zatiaľ chýbajú tieto údaje



**Európska únia**  
Európsky fond regionálneho rozvoja



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



# Wilsonova choroba

- závažné metabolické ochorenie z hromadenia medi
  - akumulácia v pečeni – zánik pečeňových buniek
  - akumulácia v mozgu – psychiatrické príznaky
  - nešpecifické príznaky – ťažká klinická diagnostika
- incidencia 1 : 30 – 100 000
- zodpovedný gén: *ATP7B*
  - lokalizácia: 13q14.3
  - veľkosť: 80 kb
  - počet exónov: 21
  - kauzatívne mutácie: doteraz popísaných viac ako 300
    - výrazné rozdiely v škále medzi populáciami
- presná a včasná diagnostika je esenciálna pre účinnú terapiu

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





# Neurofibromatóza typu 1

- závažné progresívne ochorenie s variabilnou škálou príznakov
  - tumory, nálezy na CNS, deformácie, zvýšený výskyt maligných tumorov
- incidencia: 1 : 3 – 4 000
- zodpovedný gén: *NF1*
  - lokalizácia: 17.q11.2
  - veľkosť: 280 kb
  - počet exónov: 27
  - kauzatívne mutácie – široká škála, rôzne typy
    - vysoký podiel *de novo* mutácií
    - výrazné rozdiely medzi populáciami
- znalosť mutačnej škály v danej populácii je esenciálne pre efektívnu diagnostiku a prognózu priebehu ochorenia
  - pre slovenskú populáciu zatiaľ chýbajú tieto údaje

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ







## Ciele projektu

### Aktivita 1.1: Molekulárne-genetická analýza spoločensky závažných ochorení

- komplexná molekulárna analýza génov *CFTR*, *PAH*, *ATP7B* a *NF1* u slovenských pacientov a odhalenie škály kauzatívnych mutácií

### Aktivita 1.2: Vypracovanie a overenie efektívneho diagnostického postupu

- návrh a optimalizácia identifikácie kauzatívnych mutácií, s využitím metód moderných biotechnológií

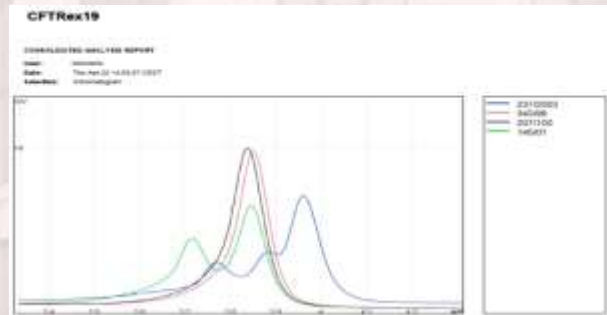
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



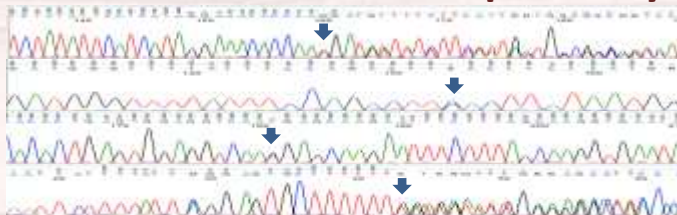
## Spôsob riešenia

### Aktivita 1.1 - cystická fibróza, fenylketonúria, Wilsonova choroba

- relatívne veľké gény – sekvenovanie celého génu je drahé a neefektívne
  1. krok – PCR amplifikácia príslušných exónov
  2. krok – DHPLC analýza amlikónov/exónov
    - vysokoúčinná skríningová metóda na identifikáciu prítomnosti sekvenčných zmien



### 3. krok – sekvenovanie pozitívnych exónov



delícia dF508  
S466X  
R553X  
inzercia T na poz. 2634

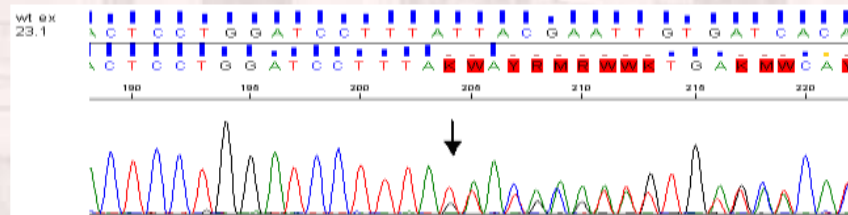
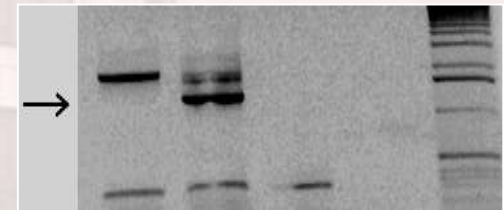
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



## Spôsob riešenia

### Aktivita 1.1 – neurofibromatóza typ 1

- vysoký podiel *de novo* mutácií
- veľká časť skrakuje polypeptid
  1. krok – izolácia mRNA a príprava cDNA
  2. krok – PCR amplifikácia celej cDNA v 3 prekrývajúcich sa fragmentoch
  3. krok – gélová elektroforéza fragmentov > odhalenie mutácií skraccujúcich polypeptid
  4. krok – fragmenty normálnej dĺžky
    1. DHPLC analýza na odhalenie sekvenčných zmien
    2. sekvenovanie pozitívnych fragmentov



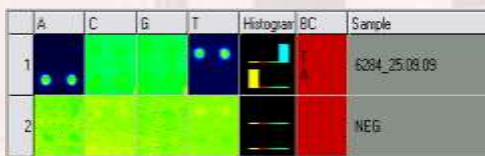
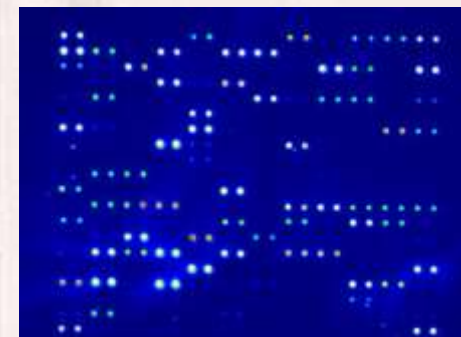
Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



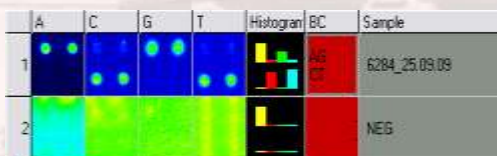
## Spôsob riešenia

### Aktivita 1.2

- cystická fibróza, fenyktonúria, Wilsonova choroba – čipová technológia
  1. krok – návrh a príprava prób pre jednotlivé identifikované mutácie
  2. krok – konštrukcia diagnostického čipu
    1. optimalizácia čipu
    2. kontrola citlivosti a špecificity
- **Výhody**
  - súčasná identifikácia veľkého počtu mutácií
  - možnosť doplnenia o ďalšie identifikované mutácie



homozygot AA/TT



heterozygot AG/TC



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



## Dosiahnuté výsledky

### Aktivita 1.1

- uskutočnili sme komplexnú molekulárnu analýzu génov zodpovedných za
  - cystickú fibrózu
  - fenylketonúriu,
  - Wilsonovu chorobu, a
  - neurofibromatózu typu 1
- získali sme poznatky o mutačnej škále a podiele jednotlivých mutácií v príslušných génoch u slovenských pacientov

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ



# Dosiahnuté výsledky

## Aktivita 1.2

- zaobstarané potrebné prístrojové vybavenie
- vypracovali a overili sme efektívny metodický postup na diagnostiku analyzovaných ochorení, využiteľný v každodennej medicínskej praxi



Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ





## Výhľad ďalšieho postupu riešenia projektu:

- Úspešné vyriešenie projektu umožní zaviesť efektívnu DNA diagnostiku analyzovaných ochorení. Vzhľadom na všeobecne nízku mutačnú frekvenciu v týchto génoch je predpoklad, že mutačná škála sa dlhé roky nebude významne meniť, čo umožní diagnostické využitie vypracovaného postupu v SR na dlhé roky.
- Implementácia výsledkov do každodennej diagnostickej praxe sa uskutoční prostredníctvom hlavného odborníka MZ SR pre lekársku genetiku. Vypracovaný metodický postup bude možné v budúcnosti aplikovať aj na ďalšie závažné dedičné ochorenia, časté v populácii Slovenska. Pracovníci zapojení do projektu aj v budúcnosti budú vyvíjať výskumnú aktivitu v tejto oblasti s využitím jednak už vlastneného a jednak v rámci projektu obstaraného prístrojového vybavenia.

Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/  
Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ

