

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-0240-12**

Funkčná analýza novoidentifikovaných DNA variantov v génoch zodpovedných za cystickú fibrózu a fenylketonúriu

Zodpovedný riešiteľ **Prof. RNDr. Ľudevít Kádasi, DrSc.**

Príjemca **Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV
2. Virologický ústav SAV
3. Biomedicínske centrum SAV
4. Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Stredoeurópsky technologický inštitút Brno, Česká Republika
2. Inštitút Molekulárnej Genetiky a Genetického inžinierstva, Belehradská Univerzita, Srbsko
- 3.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Polák E., Urge O., Kádasi L. Molekulárna genetika, fenotypová variabilita a súčasné trendy v personalizovanej medicíne fenylketonúrie. Čes-slov Pediat 2015; 70 (6): 333-341.
2. Pecimonova Martina, Polak Emil, Csicsay Frantisek, Reblova Kamila, Stojilkovic Maja, Levarski Zdenko, Kádasi Ľudevít, Soltysova Andrea: Functional and structural characterization of 5 missense mutations of the phenylalanine hydroxylase. General Physiology and Biophysics, v tlači)
3. Soltysova Andrea, Tothova Tarova Eva, Ficek Andrej, Baldovic Marian, Polakova Helena, Kayserova Hana, Kádasi Ľudevít: Comprehensive genetic study of cystic fibrosis in Slovak patients in 25 years of genetic diagnostics. The Clinical Respiratory Journal, revised

manuscript)

- 4.
- 5.

Uplatnenie výsledkov projektu

Na základe kompletizácie mutačného spektra v slovenskej populácii a informácii z funkčných analýz mutovaných PAH variantov bol vypracovaný model pre genotypovo špecifickú predikciu novej terapeutickú liečbu pomocou liečiva Kuvan pre slovenských PKU pacientov. Tento model umožní predpokladať odpoveď pacienta na túto liečbu s pomerne vysokou presnosťou a bude slúžiť ako užitočný nástroj pre klinických pracovníkov a pacientov s PKU na Slovensku. Zavedenie molekulárnych a biochemických metód na stanovenie funkčného dopadu PAH variantov vyskytujúcich sa u PKU pacientov najmä stanovenie odpovede na sepiapterín umožní v budúcnosti identifikáciu pacientov vhodných pre terapiu kofaktorom pri identifikácii či už popísaných alebo de novo identifikovaných variantov v géne PAH

Prínosom projektu bola tiež kompletizácia mutačného spektra CFTR génu v slovenskej populácii, umožnená najmä z výsledkov vyhľadávania mutácií u pacientov z predošlého obdobia, u ktorých sa vďaka sekvenovaniu celého génu podarilo uzavrieť genetická časť diagnostiky a tým sa u mnohých pacientov potvrdila diagnóza niektorých klinicky sporných pacientov. Predpokladom efektívnej DNA diagnostiky je znalosť mutačnej škály a prevládajúcich mutácií v zodpovednom géne, nakoľko existujú výrazné populačné rozdiely a preto nie je možné aplikovať údaje z iných populácií. Kompletizácia mutačného spektra poskytla údaje o možnosti využitia personalizovanej liečby, ktorá je umožnená pri niektorých typoch CFTR mutácií, ako aj výber niektorých pacientov s uzavretou diagnostikou pre klinické skúšky.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Projekt bol zameraný na molekulárnu analýzu génov CFTR a PAH u pacientov s cystickou fibrózou a fenylylketonúriou s cieľom identifikácie kauzálnych patogénnych variantov. Cieľom bolo zavedenie molekulárnych, biochemických a biofyzikálnych postupov pre fenotypové testovanie funkčného dopadu identifikovaných variantov. Počas riešenia projektu bolo v rámci mutačnej analýzy identifikovaných u 400 suspektných pacientov s CF viac ako 70 mutácií a z celkového počtu 51 PKU pacientov bola diagnóza potvrdená u 43 pacientov. Zavedenie štandardizovaných postupov pre identifikáciu variantov a poznanie mutačného spektra prispieva k zlepšeniu možností a efektivity diagnostiky založenej na DNA analýze týchto ochorení na Slovensku. V časti venovanej funkčnej charakterizácii identifikovaných variantov boli zavedené postupy pre prípravu plazmidových vektorov nesúcich sledované gény umožňujúcich propagáciu a expresiu v prokaryotických ako aj eukaryotických systémoch. Zavedené boli postupy pre stanovenie špecifickej enzymatickej aktivity PAH, pričom purifikácia exprimovaných PAH proteínov umožnila tiež stanovenie hladiny expisie, sledovanie vzniku funkčných tertramérnych foriem ako aj vplyvu molekulárnych šaperónov. Stanovenie odpovede mutantných variantov na sepiapterín umožnilo identifikáciu pacientov vhodných pre terapiu kofaktorom. Funkčná analýza CFTR spočívala v príprave vektora nesúceho CFTR gén umožňujúceho expresiu v eukaryotických bunkách s následným meraním aktivity CFTR kanála pomocou metódy patch clamp. Zavedenie vypracovaných postupov prispieva k základným poznatkom o mechanizmoch molekulárnej patológie daných ochorení a prispieva k zlepšeniu možností diagnostiky ako aj efektívnej terapie.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The aim of the project was the molecular analysis of the CFTR and PAH genes in patients with cystic fibrosis and phenylketonuria to identify causal pathogenic variants. The aim was

also the introduction of molecular, biochemical and biophysical methods for phenotypic testing of the functional impact of the identified variants. During the project more than 70 proven mutations were identified in nearly 400 suspected CF patients, and from a total of 51 PKU patients, the diagnosis was confirmed by identification of two causal mutations in 43 patients. Introducing of standardized procedures for mutational analysis and the identification of mutation spectrum contributes to the routine diagnostic of these diseases in Slovakia. The second part was devoted to the functional characterization of the identified variants, procedures for preparation of plasmid vectors carrying studied genes were established to enable the propagation and expression in prokaryotic and eukaryotic systems. Methods for specific enzymatic activity of PAH were introduced, where purification of expressed PAH proteins allowed as well the determination of expression levels, tetramer-form detection and impact of molecular chaperons. Responsiveness of mutant variants to sepiapterin allows for the identification of patients eligible for cofactor treatment. The functional analysis of CFTR was to prepare the vector carrying the whole CFTR gene allowing expression in eukaryotic cells, to measure the activity of CFTR channel using the patch clamp method. Introduction of the above procedures contributes to basic knowledge of the mechanisms of the molecular pathology of the diseases and also contributes to the improvement of routine diagnostic and effective treatment.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

Prof. RNDr. Ľudevít Kádasi, DrSc.

V Bratislave 27.1.2017

Štatutárny zástupca príjemcu

prof. RNDr. Silvia Patoreková, DrSc

V Bratislave 27.01.2017

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu