

Slovenská spoločnosť lekárskej genetiky
Jesseniova lekárska fakulta UK
Univerzitná nemocnica Martin

Martinská genetická konferencia

19. a 20. marca 2026

Martin, hotel Turiec

Zborník abstraktov

Štvrtok 19.3.2026

Plenárne prednášky

EATRIS – podpora silnejšieho premostenia medzi vedou a klinickou praxou

Autor: Halašová E.

Deoxyribonukleáza 1/3

Autori: Celec P., Janovičová E.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod Extracelulárna DNA je tzv. damage-associated molecular pattern (DAMP), ktorý aktivuje imunitné bunky a vedie k zápalu. Odstraňovanie extracelulárnej DNA zabezpečujú deoxyribonukleázy (DNázy) 1 a 113. Zataľ, čo DNáza 1 odstraňuje voľnú DNA, DNáza 113 štiepi polynukleozómy, preto jej inhibítorom je heparín, ktorý ako polyanión vytláča DNA z väzby s histónmi. Metódy V literatúre je popísaný genetický model deficitu DNázy 113. V našich rukách sme na ňom nevideli žiaden fenotyp okrem vyššej frakcie di-, resp. polynukleozómov v plazme. Na myškách s deficitom DNázy 113 sme postupne indukovali sepsu, kolagénom-indukovanú artritídu a rôzne modely anémie. Výsledky Názna lupusu, resp. lupusovej nefritídy sme ale videli len po synergickom efekte s inými DAMP molekulami, pričom mechanizmus môže byť relevantný aj pre iné patologické procesy. Zásadným nedostatkom je, že sme neboli schopní zaviesť metódu na meranie aktivity tohto enzýmu. Záver Význam výskumu DNázy 113 je potvrdený aj nedávnou holandskou štúdiou GWAS na vzorkách z neinvazívnej prenatalnej diagnostiky, kde práve lokus DNázy 113 bol identifikovaný ako zásadný pre kvantitu i fragmentáciu extracelulárnej DNA. Polymorfizmy génu pre DNázu 113 asociované s rizikom pre lupus, ale aj reumatoidnú artritídu budú mať zrejme význam aj pre diagnostické, resp. skriningové aplikácie extracelulárnej DNA.

Hereditárny angioedém – od klasifikácie po epidemiológiu na Slovensku

Autori: Jeseňák M., Markocsy A., Hrubíšková K., Petrovičová O., Šlenker B., Jurková Malicherová E., Kapustová L., Spurná V., Medved'ová E., Ružinák Bobčáková A.

Mitochondrie a sterilný zápal

Autori: Vlková B., Macáková K., Pastorek, M., Celec, P.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Mitochondrie majú prokaryotický pôvod a niektoré ich vlastnosti zostávajú imunostimulačné aj ako súčasť eukaryotických buniek. Patria medzi ne formované peptidy, ale aj mitochondriálna DNA, ak sa dostanú mimo bunky.

Metódy: Izolované mitochondrie boli injektované intraperitoneálne a následne s časovým odstupom bola indukovaná pneumónia intratracheálnou aplikáciou *S. aureus*. Tento model bol realizovaný na mladých i starých myškách, ale aj na genetických modeloch s deficitom Pad4. Medzi výstupné parametre patrili okrem mortality aj počty neutrofilov a baktérií v lavážach pľúc.

Výsledky: Potvrdili sme chemotaktický efekt mitochondrií, ktorý viedol k zhoršeniu následnej pneumónie. Hoci chemotaxia neutrofilov bola u starších myší slabšia, rozdiely v pneumónii neboli výrazne ovplyvnené ani vekom, ani genotypom myší. Záver Neutrofilové aj po miliónoch rokoch evolúcie stále rozpoznávajú prokaryotické vlastnosti mitochondrií a má to význam pri hojení rán, lenže zároveň to oslabuje ochranu organizmu po traume voči infekciám. Vysvetľuje to klinicky častý jav zápalov pľúc po závažných zlomeninách. Aktuálny projekt ukáže, či podobne možno vysvetliť aj infekcie po pôrode, najmä po sekcii, ktoré sú aktuálne riešené paušálne antibiotikami.

Klinická genetika I.

Charakteristika CTNND2 – asociovaného neurovývinového ochorenia

Autori: Weis D., Shabsavani M., Wincent J., Lindstrand A.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Heterozygotné varianty v géne CTNND2, ktorý kóduje špecifický proteín δ -katenín lokalizovaný v mozgu, sú spájané so širokým spektrom neurovývinových porúch. Sem patria dyslexia, porucha pozornosti s hyperaktivitou, postihnutie intelektu a poruchy autistického spektra. Napriek ich klinickému významu zostáva úplné fenotypové spektrum porúch asociovaných s CTNND2, ako aj úloha δ -katenínu v roli bunkovej adhézie, nedostatočne objasnená.

Metódy: V rámci medzinárodnej spolupráce sme zhromaždili klinické a molekulárne údaje 57 jedincov s heterozygotnými variantmi v CTNND2, z ktorých 42 doteraz nebolo publikovaných. Klinické hodnotenie prebehlo u miestnych špecialistov a varianty boli identifikované pomocou exómového alebo genómového sekvenovania, klinických mikroarrayov alebo karyotypizácie. Na štúdium vplyvu straty δ -katenínu na skorú neurogenézu sme uskutočnili neurálnu diferenciáciu a transkriptomickú analýzu v troch neurálnych kmeňových bunkových líniiach odvodených od pacientov a v troch líniiach s knockoutom CTNND2 vytvoreným pomocou CRISPR-Cas9. V jednej pacientovej línii sme analyzovali aj vývoj cerebrálnych organoidov a testovali moduláciu signálnych dráh s cieľom zachovania fenotypu.

Výsledky: Identifikovaných bolo 41 variantov CTNND2, vrátane 12 už známych „loss of function“ variantov a jedného missense variantu, ako aj 28 nových variantov (10 missense a 18 predpokladaných „loss of function“). Osem nových variantov vzniklo de novo a dvanásť bolo zdedených od rodiča s neurovývinovým fenotypom. Najčastejšími klinickými prejavmi boli zaostávanie vo vývoji (90 %), intelektové postihnutie (74 %) a behaviorálne abnormality (79 %). Funkčné štúdie preukázali poruchu skoršej neurogenézy v jednej pacientovej línii, charakterizovanú abnormálnou tvorbou neurálnych rozet. Transkriptomická analýza odhalila dereguláciu WNT signalizácie a čiastočné zachovanie fenotypu po jej modulácii.

Záver: Štúdia definuje klinické prejavy neurovývinových porúch asociovaných s CTNND2 a opisuje rozpoznateľný, hoci variabilný fenotyp prekrývajúci sa s inými formami intelektového postihnutia a autizmu. Výsledky naznačujú možné korelácie medzi genotypom a fenotypom a poukazujú na kľúčovú úlohu δ -katenínu pri regulácii WNT signalizácie počas skorého vývoja nervového systému, čím prispievajú k lepšiemu porozumeniu týchto porúch a podpore personalizovanej diagnostiky a terapie.

Difúzní neepidermolytická palmoplantárni keratodermie spôsobená novou splice-site variantou genu DSG1: kazuistika

Autori: Koudová M., Bittóová M., Černá L., Urbanová M., Hodúlová M., Honysová B., Svatoň J., Stejskal D.

Štuktúrovaný abstrakt: Palmoplantárni keratodermie (PPK) predstavujú geneticky heterogennú skupinu dedičných porúch keratinizácie charakterizovaných symetrickou hyperkeratózou dlaní a plosek. Klinicky se PPK delí na difúzní, fokální, striátní a punktátní formy, u difúzních forem se na základě histopatologického nálezu rozlišuje epidermolytická a neepidermolytická varianta. Difúzní neepidermolytická PPK (DNEPPK) je vzácná jednotka, která může být podmíněna patogenními variantami v několika genech. Presentujeme 74letého muže s celoživotně přítomnou difúzní hyperkeratózou obou dlaní a plosek. Podobné kožní projevy byly přítomny u více příbuzných napříč generacemi (dcera, bratr, otec, babička a teta z otcovy strany), což podporuje autozomálně dominantní typ dědičnosti v rodině. DNA izolovaná z periferní krve byla vyšetřena metodou NGS – sekvenováním celého exomu (WES; Twist) na klinicky validované platformě s vysokým pokrytím (NovaSeq X Plus, Illumina).

Bioinformatické zpracování (interní pipeline a Franklin, Genoox) zahrnovalo mapování na referenční genom GRCh38, volání a anotaci variant a klinicky řízenou filtraci. Prioritizace kandidátních variant byla vedena fenotypem dle HP:0007447 (Diffuse palmoplantar hyperkeratosis) a zahrnovala hodnocení SNV/indel i CNV. Byla identifikována dosud nepopsaná heterozygotní varianta v kanonickém akceptorovém místě sestřihu c.1688-2A>C (IVS12-2A>C) genu DSG1, která nebyla nalezena v dostupných populačních databázích ani v literatuře. Dle kritérií ACMG/AMP byla klasifikována jako pravděpodobně patogenní (class 4). Analýza cDNA prokázala aberantní sestřih genu DSG1. Prediktivní testování metodou Sangerova sekvenování potvrdilo segregaci varianty s fenotypem v rodině: varianta prokázána u postižené dcery (52 let) s mírnějším fenotypem a vyloučena u nepostiženého syna (53 let). Další příbuzní zatím vyšetřeni nebyli. Germline varianty genu DSG1 jsou etablovanou příčinou autozomálně dominantní PPK (OMIM 148700) se striátním, fokálním i difúzním fenotypem; popisy DSG1 specificky u difúzní neepidermolytické formy jsou však méně časté. Tato kazuistika rozšiřuje spektrum patogenních variant DSG1 a zdůrazňuje přínos NGS v diagnostice dědičných kožních onemocnění, včetně významu funkční verifikace nových sestřihových variant.

Gen TTN a klinická heterogenita titinopatií

Autori: Hladíková A., Kyselová K., Sklenářová J., Holbová M.

Štuktúrovaný abstrakt: Gen TTN (2q31.2) kóduje titin, gigantický protein sarkomery o délce až 35 991 aminokyselin (364 exonů), který funguje jako „molekulární pružina“ a je klíčový pro strukturální integritu a elasticitu svalových vláken. Titin hraje zásadní roli ve vývoji, mechanických a regulaci srdečního i kosterního svalu. Patogenní varianty genu TTN – titinopatie – jsou asociovány se širokým spektrem onemocnění s variabilními fenotypy i typem dědičnosti. Kardiální titinopatie se manifestují především jako dilatační kardiomyopatie (DCM) s progresivním srdečním selháním, rizikem arytmií a náhlé srdeční smrti, vyznačující se neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou. Trunkační varianty (TTNtv) jsou častou příčinou DCM, zatímco u hypertrofické kardiomyopatie jsou vzácné. Specifické varianty mohou rovněž způsobovat arytmogenní kardiomyopatii pravé komory. Neuromuskulární fenotypy (skeletální titinopatie) jsou většinou důsledkem recesivní (biallelické) kombinace TTNtv či missense variant; dominantní formy jsou vzácnější. Klinický obraz sahá od časnýchvrozených myopatií s hypotonií po pozdní svalové dystrofie s postižením distálních svalů či pletencovou slabostí. Vzácně se vyskytuje kombinovaný kardioskeletální fenotyp. V prezentaci představujeme kazuistiky ilustrující genetickou variabilitu titinopatií: První sdělení se týká rodiny s familiární kardiomyopatií s opakovaným výskytem náhlého úmrtí, kde byla identifikována patogenní varianta TTN c.73524T>A (p.Tyr24508Ter) s autozomálně dominantní dědičností. Rodina demonstruje variabilitu od asymptomatických jedinců až po těžké selhání s manifestací ve 3.–5. dekadě. Druhá kazuistika představuje 17-letého chlapce se strukturální myopatií typu central core disease s počátkem v kojeneckém věku u kterého až WES odhalila vzácnou digenní dědičnost: kombinaci heterozygotní p. patogenní varianty v genu TTN c.46609_46610del p. (Gln15537AspfsTer3) a hemizygotně přítomné patogenní varianty v genu SRPK3 c.257G>T, p.(Gly86Val).

Hyper IgM syndróm – unikátne genetické pozadie choroby na strednom Slovensku

Autori: Markocsy A., Ružinák Bobčáková A., Jeseňák M.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Hyper IgM syndróm (HIMS) je vrodená porucha imunity, ktorá vzniká v dôsledku poruchy izotypového prepnutia tried imunoglobulínov, čo vedie k nízkym koncentráciám IgG, IgA a IgE. HIMS je charakterizovaný dvoma klinickými fenotypmi. Môže prebiehať pod obrazom ťažkej kombinovanej imunodeficiencie (SCID-like) s včasným rozvojom závažných infekčných komplikácií, cytopénií (neutropénia), neprospievania. Mier-

nejší fenotyp sa prejavuje recidivujúcimi infekciami, lymfadenopatiou. V terapii sa využíva substitúcia imunoglobulínov, vďaka ktorej vieme u pacientov predchádzať vzniku infekčných komplikácií. Pri závažnejšom priebehu (SCID-like) je možná transplantácia krvotvorných kmeňových buniek. Najčastejšie je asociovaný s molekulárnymi defektami v génoch pre CD40 ligand (CD40L, 75% prípadov) a aktiváciou indukovanú cytidín deaminázu (AICDA, 20% prípadov). Zriedkavejšie v génoch pre CD40, uracil-DNA glykozylázu (UNG) a post-meiotickú segregáciu 2 (PMS2). Imunologický laboratórny nález môže byť prítomný aj pri iných syndrómových ochoreniach ako Ataxia teleangiectázia (ATM), Nijmegenský zlomový syndróm (NBN), syndróm NEMO/ Inkontinentia pigmenti (IKBKG). Deficit CD40L a IKBKG majú X-viazanú recesívnu dedičnosť. U ostatných chorôb je dedičnosť autozómovo recesívna.

Materiál a metódy: Realizovali sme retrospektívnu analýzu klinickej a laboratórnej manifestácie a molekulárno-genetickej etiológie pacientov s HIMS dispenzarizovaných v Centre pre vrodené poruchy imunity JLFUK a UN Martin. Molekulárno-genetické vyšetrenie bolo realizované cieľným sekvenačným vyšetrením AICDA génu, respektíve masívnym paralelným sekvenovaním klinického exómu s virtuálnym panelom génov asociovaných s primárnymi imunodeficienciami.

Výsledky: U 4 pacientov s HIMS boli prítomné recidivujúce infekčné komplikácie (sinusitída, otitída, bronchopneumónia) a typický laboratórny nález. Molekulárno-genetickým vyšetrením bol u všetkých identifikovaný zriedkavý patogénny variant c.259T>C, p.Cys87Arg v géne AICDA v homozygotnom, resp. heterozygotnom stave. Tento variant bol doteraz opísaný len v jednej súhrnnej publikácii u pacientky z Českej republiky.

Záver: Pravdepodobne je variant c.259T>C, p.Cys87Arg v géne AICDA rozšírený v oblasti strednej Európy s vyšším počtom heterozygotných nosičov.

Klinická genetika II.

Automatizácia a AI v genetike. Prednáška je podporená firmou PentaGen

Autori: Ličko V.

Štruktúrovaný abstrakt: V ére moderného genetického testovania rastie množstvo údajov a komplexnosť analytických procesov – od spracovania sekvenačných dát až po klinickú interpretáciu výsledkov. V tejto prednáške predstavíme, ako automatizácia a umelá inteligencia menia tradičné genetické pracovné postupy a zvyšujú efektivitu molekulárnych laboratórií. Ukážeme, ako platforma SeqOne zjednodušuje a automatizuje bioinformatickú analýzu sekvenačných dát a ako jeho funkcia DiagAI podporuje rýchle a transparentné hodnotenie genetických variantov, čo je kľúčové v klinickom rozhodovaní.

Ďalej predstavíme možnosti custom hybridizačných capture panelov od IDT, ktoré poskytujú flexibilné a cieľné riešenia pre NGS workflow a umožňujú presné obohatenie cieľových oblastí genómu podľa špecifických výskumných či diagnostických potrieb.

Prednáška ponúkne prehľad o tom, ako kombinácia inteligentného softvéru, automatizácie a cieľných sekvenačných riešení prispieva k rýchlejšej, štandardizovanej a klinicky robustnej genetickej diagnostike.

Nový variant v MT-TI géne u 10-ročnej pacientky s cerebelárnou atrofiou a WPW syndrómom

Autori: Giertlová M., Tabačáková K., Okál'ová K., Ptáčková H., Tesařová M., Honzík T.

Štruktúrovaný abstrakt: Prezentujeme unikátnu kazuistiku t.č. 10 ročnej pacientky, u ktorej bol na úrovni mitochondriálnej DNA detegovaný nový variant m4311G>A v géne MT-TI v heteroplazmii 86 - 98% v rôznych tkanivách. Identický variant bol u matky potvrdený na úrovni

23 -37%, nebol prítomný u zdravej sestry. Pacientka mala primeraný včasný PMV, v neurologickom a psychologickom sledovaní je od 7. roku života pre dyspraxiu jemnej motoriky, ADHD, pedes plani. V očnom náleze je astigmatizmus mixtus, myopia, obmedzená motilita bulbov. Vo veku 8,5 roka bola realizovaná diagnostická hospitalizácia, počas ktorej sa potvrdila elevácia laktátu v likvore a pozitívny dynamický laktátový test, MRI vyšetrenie mozgu potvrdilo výraznú atrofiu mozočku, menej mozgovej kôry a nešpecifická ložiská v bielej hmote. Pacientka mala EEG abnormity, t.č. klinického korelátu, bez liečby. EKG vyšetrením sa potvrdil Wolf-Parkinson-White syndróm. Funkčné analýzy na úrovni kožno-svalovej biopsie nie sú jednoznačné pre mitochondriálnu poruchu a pokračujeme trio-WGS analýzou.

Spinocerebelárna ataxia 27 B – potenciálne liečiteľné ochorenie v kazuistikách

Autori: Jungová P., Iskrová K., Bartošová A., Lisá D., Petrovič R.

Štuktúrovaný abstrakt: Spinocerebelárna ataxia 27B je relatívne novo popísané, autozómovo dominantne dedičné ochorenie dospelého veku, ktoré podmieňuje expanzia repetitívneho GAA úseku vo FGF14 géne. Podľa publikovaných údajov je vo svete pomerne vysoké zastúpenie ochorenia u skupín pacientov s nediagnostikovanou late-onset spinocerebelárnou ataxiou. Ochorenie má redukovanú penetranciu pri alelách s 250-300 opakovaniami, úplná penetrancia sa očakáva pri výskyte alely nad 300 opakovaní. Na troch kazuistikách prezentujeme vybraných pacientov s potvrdeným ochorením na našom pracovisku. Uvádzame základné charakteristiky ochorenia s cieľom prispieť k diferenciálno diagnostickej úvahe lekárskeho genetika u pacientov so spinocerebelárnou ataxiou, ktorá je podstatná aj vzhľadom k potenciálnej špecifickej symptomatickej terapii ochorenia 4-aminopyridínom.

Pacienti s nestanovenou genetickou diagnózou v ambulancii lekárskeho genetika – kazuistiky

Autori: Giertlová M. a kol.

Štuktúrovaný abstrakt: V súčasnej v ére dostupnosti genomických metód dosahuje diagnostická výnosnosť pre zriedkavé ochorenia na úrovni (trio-)WES/WGS 30 – 50 %. Úspešnosť diagnostiky závisí od mnohých faktorov - od veku nástupu príznakov a ich závažnosti, fenotypového prejavu a v podstatnej miere od typu využívaných technológií, kvality analýzy a bioinformatického prístupu. Významnú úlohu zohráva výskyt ochorenia u viacerých členov rodiny a dostupnosť zdravých príbuzných k DNA analýze. Napriek maximálnej snahe na strane klinickej aj laboratórnej ostáva podstatná časť pacientov s neurčenou genetickou diagnózou. Pre pacientov z toho vyplývajú prekážky na úrovni zdravotnej starostlivosti aj sociálnej podpory. Prezentujeme vybrané zaujímavé kazuistiky našich pacientov, u ktorých sme na úrovni trio-exómovej alebo trio-genómovej analýzy nestanovili genetickú príčinu. Z charakteru práce lekárskeho genetika prirodzene vyplýva potreba pokračovania analýz na vedeckej úrovni u podstatnej časti pacientov a potreba užšej spolupráce medzi vedeckými a klinickými pracoviskami. „Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V03-00007“.

Upratovali sme v archíve - unikátne chromozómové prestavby

Autori: Melišová K., Ďurina P., Jungová P., Čulenová M., Fojtíková M., Zmajkovičová D., Drozdíková V., Tomka M.

Štuktúrovaný abstrakt: ÚLBGaKG je od 1.1.2025 presťahovaný z Amerického námestia do priestorov UNB Staré mesto. Na Americkom námestí bol od počiatku vytvorený archív, v ktorom sa nachádzali chorobopisy od r. 1974 do r. 2024. V záujme zachovania informácií sme sa rozhodli Fuzik year vytriediť najstaršie chorobopisy a prevziať ich do nových priestorov ústavu. Chorobopisy pacientov od r.2016 sa nachádzajú v pôvodnej podobe v Centrálnom ar-

chíve UNB Staré mesto. Reálne sme vytriedili viac ako 28 000 kariet. Pri triedení sme sa dostali k veľmi zaujímavým nálezom. Dva z nich prezentujeme - jedná sa o dve rodiny s dvojnásobnými chromozómovými prestavbami. Kazuistika 1: karyotyp 46,XY,t(10;13)(q26;q22),t(17;18)(q25;q21) Kazuistika 2: karyotyp 46,XY,der(2)(q36),t(2;4)(q36;q35)inv(2)(p22q36),der4,t(2;4)(q36;q35) V oboch prípadoch riešime prenatálnu genetickú diagnostiku, porovnávame biologické správanie prestavieb v rámci jednotlivých rodín. Popri klasickej cytogenetickej analýze využívame molekulárno - cytogenetické a molekulárne metódy.

TSC – like MRI nález pri fokálnej epilepsii: Kazuistika DEPDC5 – asociovanej mTORpatie

Autori: Harkotová D., Paučinová I., Takáčová M., Žibek Ševčíková L., Zelinková H., Kováčová E.

Štuktúrovaný abstrakt: Prezentujeme kazuistiku chlapca s fokálnou epilepsiou, u ktorého bol na základe MRI mozgu vyslovený suspektný záver tuberóznej sklerózy. Napriek TSC-like nálezu na mozgu, neboli u pacienta prítomné žiadne systémové TSC prejavy. Molekulárno-genetické vyšetrenie preukázalo heterozygotný patogénny variant v géne DEPDC5. Klinický obraz pacienta zodpovedal diagnóze Familiárna fokálna epilepsia s variabilnými ložiskami typu I (DEPDC5 asoc.). DEPDC5 aj TSC1/TSC2 asociované ochorenia patria medzi tzv. mTORpatie, ochorenia spôsobené dysreguláciou signalizačnej dráhy mTOR. Porucha tejto dráhy v nervovom tkanive môže viesť k vzniku fokálnych malformácií mozgovej kôry a heterotopií, čo vysvetľuje podobnosť MRI nálezov u DEPDC5-asociovej epilepsie a tuberóznej sklerózy. Kazuistika zdôrazňuje význam genetického vyšetrenia pri diferenciálnej diagnostike epilepsií s TSC-like MRI nálezom a jeho dopad na ďalší manažment a genetické poradenstvo.

Zaujímavé oční kauistiky z genetické ambulance

Autori: Kremlíková Puorová R., Vejvalková Š., Zabanová A., Cibulková P., Kyselová K.

Štuktúrovaný abstrakt: Genetika sa v poslednej dobe stáva veľmi užitočným pomocníkom oftalmologa v diagnostike zejména vrozených, ale i později nastupujících závažných poruch zraku. V dětském věku je uváděna genetická příčina až u 60 % nevidomých. Série kazuistických sdělení ukáže přínos genetického vyšetření a jeho zásadní vliv na stanovení diagnózy a následnou oftamologickou péči.

Generalizovaná pustulózná psoriáza: od genetiky k liečbe

Autori: Lichvariková N., Sýsová L., Urbán V., Lohajová Behulová R.

Štuktúrovaný abstrakt: Generalizovaná pustulózná psoriáza: od genetiky k liečbe Natália Lichvariková¹, Lenka Sýsová¹, Veronika Urbán¹, Regína Lohajová Behulová¹ ¹ Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety Generalizovaná pustulózná psoriáza (GPP) je zriedkavá a potenciálne život ohrozujúca forma psoriázy s náhlymi, bolestivými výsevmi sterilných pustúl a systémovým zápalom, ktoré môžu viesť k infekciám, srdcovému zlyhaniu či smrti. Často sa prejaví prvýkrát vo veku 40–50 rokov, s vyššou prevalenciou u žien. GPP predstavuje autozápalové ochorenie sprostredkované hyperaktívaciou vrodenej imunity. Základným mechanizmom je dysregulácia IL-36 cytokínovej dráhy, ktorá vedie k nekontrolovanej aktivácii signálnych dráh NF- κ B a MAPK. Výsledkom je nadmerná produkcia prozápalových cytokínov, masívna infiltrácia neutrofilov do epidermis a tvorba sterilných pustúl. Patofyziológia zahŕňa genetické predispozície ako aj environmentálne faktory. Diagnostika GPP je náročná, nakoľko je potrebné odlíšiť ju od iných pustulózných dermatóz. Liečba pacientov zahŕňa systémové nasadenie kortikosteroidov, ktoré rýchlo zmierňujú príznaky, no častokrát prinášajú závažné vedľajšie účinky, vyššiu úmrtnosť a kratšiu remisiu. Význam genetického vyšetrenia GPP spočíva v identifikácii mutácií, ktoré ovplyvňujú aktiváciu IL-36 dráhy a tým

aj odpoveď na biologickú liečbu, čo umožňuje personalizovanú terapiu a výber najúčinniejšieho liečiva. Prvým cielene schváleným liekom je anti-IL-36R protilátka spesolimab s rýchlym nástupom účinku. Na našom pracovisku vykonávame diagnostiku GPP pomocou analýzy klinického exómu, pričom sa zameriavame na analýzu deviatich kľúčových génov: CARD14, HLA-C, IL23R, IL36RN, MPO, NOD2, SERPINA3, TRAF3IP2 a ZNF750. Mutácie v génoch IL36RN a CARD14 sú najčastejšie spojené s predispozíciou ku GPP. Genetické testovanie pacientov s GPP umožňuje presnejšiu diagnostiku, identifikáciu rizikových pacientov a pomáha k nastaveniu personalizovanej terapie.

Prenatálna genetická diagnostika a PGT

Sekvenovanie novej generácie: Komplexné riešenia pre kliniku aj výskum.

Prednáška je podporená firmou I.T.A., s.r.o.

Autori: Jochmanová E., Beránková R.

Štuktúrovaný abstrakt: Sekvenovanie novej generácie (NGS) dnes predstavuje neoddeliteľnú súčasť klinickej genetiky aj biomedicínskeho výskumu. Príspevok sa zameria na komplexné technologické riešenia pokrývajúce spektrum aplikácií od výskumných projektov až po rutinnú diagnostiku.

V oblasti long-read sekvenovania predstavíme možnosti platformy Oxford Nanopore Technologies, ktorá umožňuje analýzu dlhých fragmentov DNA a RNA v reálnom čase. Táto technológia prináša výhody najmä pri detekcii štrukturálnych variantov, analýze repetitívnych oblastí genómu, fázovaní haplotypov či sekvenovaní celých génov vrátane komplexných lokusov. Osobitná pozornosť bude venovaná amplicónovým stratégiám, sekvenovaniu celých génov a možnostiam rýchlej implementácie do laboratórnej praxe.

V oblasti short-read sekvenovania sa budeme venovať IVDR certifikovaným sekvenátorom spoločnosti GeneMind Biosciences, ktoré sú vhodné pre klinické aplikácie vyžadujúce vysokú presnosť, štandardizované pracovné postupy a súlad s regulačnými požiadavkami. Predstavíme ich využitie pri panelovej diagnostike, exómovom sekvenovaní aj cielej analýze variantov.

Súčasťou prednášky bude aj diskusia o možnostiach automatizácie a štandardizácie pracovných postupov s cieľom zjednodušiť laboratórne protokoly, minimalizovať variabilitu medzi operátormi a zvýšiť reprodukovateľnosť výsledkov. Zameriame sa na optimalizáciu workflow od prípravy knižníc až po bioinformatickú analýzu dát.

Cieľom príspevku je poskytnúť prehľad moderných sekvenačných riešení a ukázať, ako efektívne integrovať long-read aj short-read technológie do klinickej aj výskumnej praxe.

Prenatálne a postnatálne fenotypy asociované s patogénnymi variantami v génoch

COL4A1 a COL4A2

Autori: Geryková Bujalková M., Pfeifer M., Binder J., Laccone F.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Heterozygotné patogénne varianty v génoch *COL4A1* a *COL4A2* sú asociované s osobitnou formou cerebrálnej mikroangiopatie (“brain small vessel disease“) so skorým nástupom, ktorá sa môže prejavovať širokým spektrom variabilných klinických príznakov a anomálií mozgu, vrátane opakovaného pre- a neonatálneho intrakraniálneho krvácania a infarktov, porencefálie, leukoencefalopatie, ventrikulomegálie, kortikálnych malformácií (schizencefália, polymikrogýria, heterotópie), mikrocefálie, vývojového a kognitívneho zaostávania, epilepsie a hemiplegickej mozgovej obrny. Varianty v génoch *COL4A1/A2* vykazujú neúplnú penetranciu a veľmi variabilnú expressivitu.

Metódy: Prezentované prípady boli diagnostikované rutínnym exómovým sekvenovaním, buď prenatálne pomocou trio-exómového vyšetrenia fetálnej a rodičovských vzoriek alebo

postnatálne pomocou singleton-exómového vyšetrenia u pacientov a následného cieľného testovania identifikovaných variantov u rodičov.

Výsledky: Uvádzame fenotypové abnormality zistené prenatálnym ultrazvukovým vyšetrením u 6 plodov so štyrmi rôznymi patogénnymi (P) alebo pravdepodobne patogénnymi (LP) variantami v génoch *COL4A1* a *COL4A2*. Všetky plody zdedili identifikované varianty od jedného klinicky zdravého rodiča. Okrem toho uvádzame fenotyp 3 pacientov diagnostikovaných postnatálne a nesúcich dva rôzne P alebo LP varianty v géne *COL4A1*.

Záver: Naše výsledky podčiarkujú význam exómového sekvenovania u plodov, novorodencov a detských pacientov s intrakraniálnym krvácaním, štruktúrnymi mozgovými anomáliami a/alebo detskou mozgovou obrnou, ktoré umožňuje diagnostikovať zriedkavé monogénové príčiny vrátane cerebrálnych mikroangiopatií so skorým nástupom.

Syndrom fragilného X - výhody priamej detekcie v rámci PGT-M

Autori: Valentová E., Weisová K., Kubíček D., Navrátil R., Hornák M., Brožek R., Veselá K.

Štruktúrovaný abstrakt:

Úvod: Syndrom fragilného X je dedičné X-vázané ochorenie, ktoré je spôsobené expanziou CGG repetícií v genu *FMR1*. Za normálny nález sa považuje počet repetícií do 55. Osoba s počtom repetícií od 55 do 200 sa označuje ako prenášeč tzv. premutácie. Tento stav nezpôsobuje u svojho nositeľa štandardné klinické prejavy ochorenia, ale u jejich gamet/embryí môže dôjsť k ďalšej expanzii repetícií do plnej mutácie (>200 repetícií), čo u postihnutých mužských potomkov vedie k rozvoju syndromu fragilného X. Štandardné postupy PGT-M umožňujú iba detekciu rizikového haplotypu na základe nepriamej diagnostiky, ktorá neodhalí, či došlo k expanzii do plnej mutácie. S využitím priameho stanovenia počtu repetícií u embryí lze transferovať i taká embryá, ktorá by bola iba na základe nepriamej diagnostiky kvôli rizikovému haplotypu z embryotransferu vylúčená.

Metody: U pacientov podstupujúcich liečbu IVF, kde partnerka bola prenášečkou premutácie, bolo vykonané PGT-M metódou karyomappingu. U biopsií trofektodermu bola vykonaná celogenomová amplifikácia (MDA). PGT-M analýza potom prebiehala na čípech Illumina – HumanKaryomap 12 SNP bead chips s následnou analýzou v BlueFuse Multi softvare alebo na čípech Infinium™ Global Screening Array-24 v3.0 BeadChip analyzovaných pomocou in-house bioinformatického softvare. Priame stanovenie počtu repetícií u vzoriek trofektodermu na odhalenie rizika expanzie bolo vykonané pomocou TP-PCR (LabGscan FRAXA PCR kit, LabGenomics®; GT FXS Detector, GENETEK BIOPHARMA GmbH).

Výsledky: Po PGT-M vyšetrení pomocou nepriamej diagnostiky bolo vyšetrených celkom 164 embryí od 29 párov. Z toho bolo doporučeno k transferu po genetickej konzultácii iba 48 % (79/164) embryí s nerizikovým haplotypom. Pomocou stanovenia priameho počtu repetícií u všetkých vyšetrených embryí bolo zistené, že k expanzii došlo iba u 17,6 % (15/85) embryí s rizikovým haplotypom. S prihliadnutím na výsledky priameho stanovenia počtu repetícií by sa počet potenciálne transferovaných embryí zvýšil na 90,9 % (149/164).

Záver: Zavedenie priameho stanovenia počtu CGG repetícií v genu *FMR1* v rámci PGT-M u testovaných embryí významne zlepší hodnotenie rizika expanzie do plnej mutácie. V porovnaní sa samotnou nepriamou haplotypovou diagnostikou umožňuje lepšie odlíšiť embryá so skutočným rizikom expanzie do plnej mutácie od embryí, ktoré nesú iba rizikový haplotyp bez dokázanej expanzie. Naše údaje ukazujú, že kombinácia nepriamej diagnostiky s priamym stanovením počtu repetícií umožnila zvýšiť podiel potenciálne transferovaných embryí takmer dvojnásobne.

Dve cesty, jedna diagnóza (kazuistika)

Autori: Lukáčová I., Magyarová D., Majerová L., Landlová D., Horváth M., Krištínová D.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Smithov-Lemliho-Opitzov syndróm (SLOS) je zriedkavé ochorenie s autozómovo recesívnou dedičnosťou. Je spôsobené mutáciami v géne *DHCR7*, ktoré vedú k deficitu enzýmu 7-dehydrocholesterolreduktázy a následne k zníženej syntéze cholesterolu. Fenotyp vykazuje výraznú klinickú variabilitu od intrauterinného úmrtia plodu až po mierne formy manifestujúce sa v dospelosti. Medzi časté prejavy patrí intrauterinné zaostávanie rastu, faciálna dysmorfia, mikrocefália, poruchy intelektu, vývojové chyby srdca, syndaktília 2. a 3. prsta nohy, abnormality genitálu u mužského pohlavia a iné. K prenatálnemu záchytnému syndrómu v súčasnosti pomáha nielen biochemický skrining, ultrazvukové vyšetrenie ale aj monogénový NIPT.

Prípad: Prezentujeme 2 pacientky, u ktorých bol spoločným nálezom pozitívny biochemický skrining s nízkou hladinou nekonjugovaného estriolu (uE3). V prvom prípade s minimálnym ultrazvukovým nálezom zaostávania rastu plodu, v druhom prípade morfológický ultrazvukový nález s početnými vývojovými chybami srdca, pravej obličky a zaostávaním v raste. Molekulovo-genetickým vyšetrením plodovej vody boli v oboch prípadoch potvrdené mutácie v géne *DHCR7* v zloženom heterozygotnom stave.

Záver: Diagnostika raritných ochorení vedie k správne manažmentu pacienta a ponúknutiu optimálnych možností ďalšieho postupu, ktoré okrem prenatálnej diagnostiky zahŕňajú aj preimplantačné genetické testovanie (PGT-M) v rámci metód asistovanej reprodukcie.

Rozšírenie Trisomy testu (NIPT) o monogénové ochorenia

Autori: Jelínková I., Ďurinová T.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Trisomy test ako neinvazívne prenatálne vyšetrenie, primárne slúžilo na detekciu najčastejších fetálnych aneuploidií, aneuploidií pohlavných chromozómov, zriedkavých autozomálnych aneuploidií, vybraných mikrodélií alebo iných subchromozómových aberácií. Od októbra 2021 bolo spektrum vyšetrení rozšírené o detekciu rizika prenosu populačne prevalentnej mutácie spôsobujúcej cystickú fibrózu (CF) a od augusta 2022 aj o panel mutácií spôsobujúcich Smithov-Lemliho-Opitzov syndróm (SLOS). Vyšetrenie CF je zamerané na detekciu mutácie F508del v géne *CFTR*. V prípade SLOS sa analyzuje sedem najčastejších patogénnych mutácií génu *DHCR7* (c.452, c.976, c.1055, c.1228, c.1289, c.326, c.964-1). Vo svete je však už aktuálne dostupných viacero komerčných testov, ktoré vyšetrujú širší panel ochorení.

Materiál a metódy: Od zavedenia metód detekcie mutácii pre CF a SLOS sme do januára 2026 vyšetřili 2 245 vzoriek na CF a 1 407 vzoriek na SLOS. Na detekciu mutácie F508del bola použitá metóda qPCR. Vyšetřenie SLOS bolo realizované metódou SNaPshot. Na rozšírenie panelu vyšetřovaných ochorení sa použil prístup resekvenovania panelu génov s ultravysokým pokrytím.

Výsledky: Výsledok „vysoké riziko“ pre CF bol vydaný u 36 vzoriek (1,6 %), ku 6 z nich (16,7 %) sa podarilo získať výsledok následného testovania matky, otca alebo plodu pričom vo všetkých 6 týchto prípadoch (100%) bol nález potvrdený. Obdobne pri vyšetření SLOS bolo vydaných 33 výsledkov „vysoké riziko“ (2,35 %), ku 7 z nich (21,2 %) sa podarilo získať výsledok následného testovania matky, otca alebo plodu pričom vo všetkých 7 týchto prípadoch (100%) bol nález potvrdený. V rámci projektu Insight bol pilotne testovaný protokol s cieľným resekvenovaním génov a s detekciou variantov fetálneho pôvodu.

Záver: Rozšírenie Trisomy testu o vyšetřenia mutácií spôsobujúcich CF a SLOS umožňuje včasnú identifikáciu nosičstva kauzálnych mutácií týchto závažných monogénových ochorení a predstavuje tak klinicky prínosný nástroj v prenatálnej diagnostike. Aktuálne prebieha projekt, ktorého zámerom je rozšíriť tieto možnosti na ďalšie monogénne dedičné ochorenia.

PGT u hatchujúcich blastocyst: Validita a interpretace genetického nálezu

Autori: Textl J.

Štuktúrovaný abstrakt: Preimplantační genetické testování (PGT) se stalo standardní součástí IVF programů, přičemž biopsie trofektodermu ve stadiu probíhajícího hatchingu blastocysty (tedy při částečném nebo kompletním opuštění zony pellucidy) představuje preferovaný přístup z hlediska diagnostické výtěžnosti i embryonální bezpečnosti. Přednáška hodnotí vliv načasování biopsie na kvalitu a reprezentativnost odebraného trofektodermu. Zvláštní pozornost bude věnována embryonálnímu mozaicismu a jeho významu při interpretaci a doporučení pro pacientky. Součástí sdělení bude prezentace výsledků IVF cyklů s PGT a jejich vztah k úspěšnosti transferů. Cílem přednášky je poskytnout klinickým genetikům rámec pro kritické hodnocení validity genetických výsledků získaných z hatchujících blastocyst a podpořit mezioborovou standardizaci interpretace nálezů v kontextu dynamického embryonálního vývoje.

Neinvazivna molekulárno-genetická diagnostika endometriózy

Autori: Černáková I., Martinková V., Jurkovičová D.

Štuktúrovaný abstrakt: Endometrióza je chronické ochorenie závislé na estrogéne, charakterizované rastom endometria mimo dutiny maternice. Endometriózne lézie sú najčastejšie prítomné v malej panve, vaječníkoch, vajcovodoch, ale ich nálezy boli popísané prakticky na všetkých orgánoch. Ak endometriálne tkanivo prerastá do svaloviny – myometria uteru, ide o adenomyózu. Ženy trpiace endometriózou či adenomyózou trpia bolesťami v súvislosti s pohlavným stykom, menštruačným cyklom, močením alebo defekáciou, špinením, nepravidelným krvácaním. Pri ťažkých stavoch a v pokročilom štádiu dochádza k vnútorným zrastom zhoršujúcimi bolesťami i celkovú situáciu. Približne jedna tretina žien s endometriózou má skúsenosti s neplodnosťou, opakovanými reprodukčnými stratami aj napriek IVF liečbe. Diagnostika endometriózy býva často oneskorená, stanovenie definitívnej diagnózy trvá aj niekoľko rokov. Samotná diagnostika spočíva v súčasnosti najmä na využití zobrazovacích a chirurgických metód. ENDOdx test vyvinutý na našom pracovisku sa opiera o epigenetickú teóriu patofyziológie ochorenia, ktorá zahŕňa pôsobenie miRNA s regulačnou funkciou. Zvolený súbor miRNA súvisí so zvýšenou proliferáciou lézií, zápalom endometria, zníženou apoptózou, angiogenezou, estrogénovou signalizáciou a progesterónovou rezistenciou. Test sa vykonáva z periférnej krvi metódou RT-qPCR, čím je možné skrátiť trvanie diagnostického procesu na niekoľko dní bez potreby akumulácie väčšieho počtu vzoriek. Diagnostika endometriózy neinvazívnym triáz testom pomáha odhaliť endometriózu a adenomyózu bez operácie, skracuje čas potrebný na stanovenie diagnózy, vedie k záchytu ochorenia vo včasnom I. až II. štádiu s následnou efektívnejšou liečbou, môže pomôcť lekárovi rozhodnúť, či je potrebné ďalšie vyšetrenie alebo liečba, zachovať fertilitu pacientky a viesť k zabráneniu vzniku bolestivých zmien a poškodeniu vnútorných orgánov endometrióznymi léziami v pokročilom štádiu. ENDOdx test možno využiť aj na monitorovanie efektivity liečby alebo rekurencie ochorenia.

Piatok 20.3.2026

Molekulárna diagnostika I.

Komplexní řešení pre short-read a long-read sekvenování včetně automatizace přípravy NGS knihoven a sekundární a terciální analýzy dat.

Přednáška je podpořená firmou 3GENES

Autori: König R.

Štuktúrovaný abstrakt: Moderní genomika stále častěji kombinuje short-read i long-read sekvenování, aby bylo možné zachytit jak drobné genetické varianty, tak komplexní strukturní změny genomu. Tato přednáška představí komplexní řešení pokrývající celý NGS workflow – od přípravy vzorku přes automatizovanou přípravu NGS knihoven až po pokročilou sekundár-

ni a terciální bioinformatickou analýzu dat. Budou prezentována řešení pro přípravu NGS knihoven společnosti Twist Bioscience, technologie long-read sekvenování PacBio a možnosti automatizace laboratorních procesů pomocí robotických platform Opentrons, zejména systémů OT-2 a FLEX NGS, které umožňují flexibilní a škálovatelnou automatizaci přípravy NGS knihoven. V oblasti bioinformatiky a interpretace genomických dat budou představeny nástroje sekundární a terciální analýzy, včetně platformy Franklin pro interpretaci genetických variant. Dále budou představeny bioinformatické softwarové nástroje a databázová řešení společnosti QIAGEN, pro kterou tuto produktovou řadu v České republice, na Slovensku, v Maďarsku a Polsku nově zastupujeme jako výhradní distributor. Patří mezi ně zejména CLC Genomics Workbench, QCI Secondary Analysis, QCI Interpret, QCI Interpret Translational, QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis, QIAGEN Omicsoft a databázová řešení HGMD, HSMD a COSMIC pro klinické i výzkumné aplikace. Cílem prezentace je ukázat, jak lze propojením vhodných sekvenačních technologií, laboratorní automatizace a pokročilé bioinformatiky vytvořit robustní, škálovatelné a prakticky využitelné řešení pro výzkumné i klinické aplikace současné genomiky.

miRNA profilovanie luminálnych podtypov karcinómu prsníka microarray metódou

Autori: Braný D., Dvorská D., Baranová I., Holubeková V., Kolková Z., Danková Z., Halašová E.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Karcinóm prsníka (KP) je najčastejším nádorovým ochorením u žien. Každoročne je na celom svete diagnostikovaný u viac ako 2 miliónov pacientiek, pričom 650 000 tomuto ochoreniu podľahne. Molekulárne pozadie vzniku a rozvoja KP zostáva stále nedostatočne objasnené a jeho liečba finančne veľmi nákladná. Jej optimalizácia, najmä v zmysle zlepšenia špecifickej terapeutickkej odpovede u jednotlivých podtypov je úzko spojená s identifikáciou nových molekulárných mechanizmov a markerov. Viaceré štúdie preukázali, že vhodnými markermi môžu byť miRNA. Z tohto dôvodu sme sa zamerali na komplexnú analýzu expresného profilu miRNA v luminálnych podtypoch KP, ktoré tvoria viac ako 60% všetkých diagnostikovaných prípadov. Materiál a metódy: V rámci štúdie bolo analyzovaných 16 vzoriek luminálnych podtypov KP a 21 kontrolných vzoriek. Úroveň expresie miRNA bola stanovená s využitím microarray metódy, ktorej výsledky boli verifikované s qPCR. Všetkým miRNA so zmenenou mierou expresie boli identifikované cieľové mRNA pomocou online nástroja miRTargetLink 2.0. Zapojenie proteínových produktov translatovaných z týchto mRNA do dráh a signalizácii asociovaných s vznikom a rozvojom KP bolo analyzované pomocou nástroja STRING®. Výsledky: Preukázali sme zmenu expresie celkovo 17 miRNA. 16 z nich bolo podexprimovaných (-2,75 až -11,02-násobne). Zvýšená miera expresie bola zistená iba v prípade miR-21a (3,10-násobne). qPCR verifikácia piatich miRNA potvrdila výstupy microarray analýz. Všetkým 17 miRNA so zmenenou mierou expresie bolo identifikovaných celkovo 454 cieľových mRNA. Z dôvodu redukcie takto vysokého počtu sme sa následne zamerali iba na 14 mRNA, ktoré boli cieľovými súčasne pre aspoň tri miRNA. Zistili sme, že proteínové produkty translatované z týchto mRNA sú zahrnuté do viacerých interakčných sietí a signalizácii spätých s vznikom a rozvojom KP. Záver: Luminálne podtypy KP sú charakterizované zníženou expresiou tumor-supresorových miRNA, následkom čoho dochádza k narušeniu post-transkripčnej regulácie expresie spektra génov. Proteínové produkty translatované z týchto génov zohrávajú dôležitú funkciu v bunkových dráhach a signalizáciách asociovaných so vznikom a progresiou KP.

Komplexné genomické profilovanie pomocou TSO 500 assay: skúsenosti z Martinského centra pre biomedicínu

Autori: Loderer D., Hornáková A., Tobiášová K., Lešková K., Halašová E., Danková Z., Biringer K., Kúdela E., Rokos T., Dzian A., Miklušica J., Mikolajčík P., Smolár M., Plank L., Grendár M.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Sekvenovanie novej generácie (NGS) predstavuje kľúčový nástroj modernej onkologickej diagnostiky na detekciu klinicky významných genetických variantov. Efektívna príprava knižníc určených na sekvenovanie kladie vysoké nároky na kvalitu vstupných nukleových kyselín. Pri rutinnom vyšetrení je však stále preferovaným zdrojom genetického materiálu formalínom fixované a parafínom zaliate tkanivo (FFPE), najmä pre jeho dlhodobú skladovaciu stabilitu a zachovanie tkanivovej architektúry. Proces fixácie však vedie k degradácii nukleových kyselín, čo môže negatívne ovplyvniť spoľahlivosť alebo realizovateľnosť NGS analýz. Na základe tohto faktu bolo primárnym cieľom tejto štúdie overiť využiteľnosť testu TSO 500 na našom pracovisku. Na základe predbežných výsledkov sme následne porovnali kvalitatívne (QC) metriky a mieru zhody pri detekcii klinicky relevantných variantov v párových čerstvo zmrazených (FF) a FFPE vzorkách.

Metódy: Komplexné genomické profilovanie vzoriek pacientov s rôznymi typmi nádorov bolo realizované pomocou testu Illumina® TruSight Oncology 500 (TSO 500) na prístroji NextSeq 550Dx. Identifikované varianty boli anotované pomocou softvéru Pierian Dx Clinical Genomics Workspace, verzia 6.20.

Výsledky: Celkovo bolo analyzovaných 700 vzoriek, pričom porovnávacia štúdia bola vykonaná na 69 párových FF a FFPE vzorkách. Výsledky poukázali na vyššiu kvalitu genetického materiálu získaného z FF tkaniva, čo sa prejavilo signifikantným zlepšením QC parametrov pripravených knižníc. Tieto zistenia potvrdili významný potenciál FF tkaniva ako primárneho zdroja genetického materiálu vyššej kvality na detekciu malých variantov, mikrosatelitnej instability a mutačnej záťaže nádoru pri použití testu TSO 500 v porovnaní so vzorkami FFPE.

Záver: Preferenčné využitie FF tkaniva by mohlo významne znížiť počet nevykonateľných NGS analýz z dôvodu nízkej kvality nukleových kyselín. Vzhľadom na nižšiu mieru zhody pri detekcii zosteriových variantov, génových fúzií a variantov počtu kópií odporúčame, aby sa budúce štúdie zamerali na detailnejšie hodnotenie týchto typov zmien pri použití testu TSO 500.

Epigenetická regulácia a génová expresia v cervikálnych steroch ako potenciálne neinvazívne biomarkery

Autori: Kašubová I., Hornáková A., Kotúľová L., Rokos T., Kolková Z., Kapinová A., Pribulová T., Kozubík E., Kalman M., Biringer K., Kúdela E., Holubeková V.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Karcinóm krčka maternice je zhubné celosvetovo sa vyskytujúce ochorenie. Často je úzko spojené s perzistujúcou infekciou ľudským papilomavírusom (HPV). Metylácia DNA je základným epigenetickým faktorom v progresii cervikálnej intraepiteliálnej neoplázie (CIN) do karcinómu krčka maternice. Epigenetické mechanizmy prispievajú k progresii nádoru a detekcia metylačného stavu genómu ako aj génová expresia sa dnes javia ako vhodný skriningový marker. Cieľ: Cieľom práce bolo analyzovať vzťahy medzi hypermetyláciou promotora, génovou expresiou vybraných génov (DNMT, BCL2, CDH1, CD8A, MUC1, ALCAM) a HPV infekciou vo vzorkách cervikálnych sterov pacientok s rôznym stupňom cervikálnych lézií. Materiál a metódy: Do štúdie bolo zaradených 81 pacientok s cervikálnymi léziami. DNA izolovaná z cervikálnych sterov bola podrobená bisulfidovej konverzii. Bisulfidovo konvertovaná DNA bola amplifikovaná a postúpená na pyrosekvenáciu. Analýza génovej expresie sa vykonala pomocou real-time PCR (qPCR). Výsledky: Pozitívny HPV status malo 40 žien (49%). Neboli preukázané štatisticky významné korelácie medzi metyláciou a CST statusom alebo HPV 16/18 infekciou. MUC1 vykazoval najväčšiu variabilitu v metylácii, s naznačeným trendom smerom k zvýšenej metylácii pri

vyšších stupňoch lézie. Metylácia génov BCL2, CD8A a ALCAM, v léziách CIN3 alebo horších, naznačuje ich možnú úlohu ako biomarkerov pokročilého ochorenia. Expresia BCL2 bola signifikantne znížená vo všetkých stupňoch lézie. Expresia CD8A bola mierne zvýšená v SIL s nízkym a vysokým stupňom, najmä vo vzorkách s pozitívnym HPV. Záver: Pre gény CDH1, MUC1, CD8A a BCL2 bola realizovaná exploratívna analýza vzťahu medzi metyláciou DNA a génovou expresiou, ktorá naprieč analyzovanými génmi naznačila trend inverznej asociácie medzi úrovňou metylácie a expresiou génov. Hoci neboli zistené štatisticky významné rozdiely v prípade detekcie metylácie DNA, pozorovaná variabilita v metylácii MUC1 naznačuje jeho potenciál ako markera progresie lézie. Zistenia poukazujú na komplexné interakcie medzi epigenetickou reguláciou a génovou expresiou v cervikálnych epitelových bunkách a podporujú potenciál neinvazívnych epigenetických biomarkerov na monitorovanie cervikálnych lézií.

Cielené NGS profilovanie somatických variantov v preoperačnej cfDNA u pacientov s kolorektálnym karcinómom podstupujúcich CME

Autori: Škereňová M., Halašová E., Šarlinová M., Loderer D., Grendár M., Tobiášová K., Miklušica J., Slezák M., Mikolajčík P., Grajciar M.

Štuktúrovaný abstrakt: Úvod: Analýza cirkulujúcej nádorovej DNA (cfDNA) umožňuje citlivú detekciu somatických genomických alterácií a predstavuje perspektívny nástroj molekulárneho profilovania nádorov. Jej využitie v preoperačnom nastavení nemetastatického kolorektálneho karcinómu (CRC), najmä u pacientov liečených kompletnou mezokolickou excíziou (CME), však zatiaľ nie je dostatočne charakterizované. Cieľom tejto štúdie bolo zhodnotiť technickú realizovateľnosť cieľného NGS profilovania cfDNA a opísať spektrum somatických variantov detegovaných pred chirurgickou liečbou.

Metódy: Preoperačné plazmatické vzorky cfDNA od 32 pacientov s CRC boli analyzované pomocou cieľného NGS panelu AVENIO ctDNA Expanded (77 génov). Pre mutačne špecifické analýzy bola vybraná homogénna kohorta 25 pacientov s pravostranným CRC, ktorí podstúpili CME s D3 lymfadenektómiou. Hodnotená bola kvalita cfDNA, sekvenačné parametre, typy somatických variantov a ich alelové frekvencie (VAF).

Výsledky: cfDNA bola úspešne izolovaná zo všetkých analyzovaných vzoriek. Sekvenovanie dosiahlo vysokú hĺbku a splnilo kvalitatívne kritériá. Aspoň jedna somatická mutácia bola identifikovaná u 76 % pacientov v analytickej kohorte. Najčastejšie mutované gény zahŕňali TP53, APC a KRAS, nasledované mutáciami v génoch GNAS, MET a CTNNB1. Priemerná VAF bola 0,9 %, pričom u jednotlivých pacientov boli zaznamenané výrazne vyššie hodnoty. Okrem bodových mutácií boli ojedinele detegované aj copy number varianty a indely.

Záver: Cielené NGS profilovanie cfDNA v preoperačnom nastavení CRC liečeného CME umožňuje citlivú detekciu klasických aj zriedkavých genomických alterácií a poskytuje molekulárny baseline pre budúce longitudinálne štúdie.

Microbiome in tumor tissue and adjacent mucosa from CRC patients

Autori: Vodička P., Andarawi S., Hanák P., Kroupa M., Liška V., Vodičková L., Naccarati A., Kostovčíková K.

Štuktúrovaný abstrakt: Introduction: Dysbiosis of bacterial and fungal communities in the bowel has been associated with inflammatory diseases and cancer. Since the most studies deal with the luminal samples of the gut content, we focused on the microbes closely associated with the mucosa. Material and methods: We collected samples of colorectal cancer tissue and adjacent non-affected mucosa from 125 patients and processed them for sequencing of 16S rRNA and ITS1 genes for bacterial and fungal microbiota profiling, respectively. Results and Discussion: Tumor-associated microbiota was enriched with potential pathogens, such as genera Fusobacterium, Treponema, Campylobacter and Selenomonas, whereas adjacent tissue

exhibited increased relative abundance of order Bacteroidales and genera Blautia, Faecalibacterium, Odoribacter and Dorea. Tumor tissue was markedly resided by fungal genera Pseudophthomyces and Peniophora, suggesting environmental origin. Stratification to gastrointestinal tract compartments showed that tumor tissues from the left side of the colon and rectosigmoidum had the highest relative abundance of genus Fusobacterium and Streptococcus, respectively. Genus Selenomonas was significantly and specifically enriched in the tumor tissue from the right side of colon. We found marked positive correlation of genus Parvimonas with Peptostreptococcus ($r=0.85$, $p=7.6 \times 10^{-15}$), Campylobacter ($r=0.82$, $p=4.6 \times 10^{-13}$), Dialister ($r=0.55$, $p=4 \times 10^{-5}$) and Fusobacterium ($r=0.54$, $p=5.4 \times 10^{-5}$) in adjacent tissue. In the biopsies from CRC patients, we have investigated relative telomere length (RTL), general and oxidative DNA damage. Whereas we found the only significant difference in RTL between tumors (shorter RTL) and adjacent mucosa, there was no association with either localization or microbial settlement. Interestingly, the levels of both general and oxidative DNA damage were significantly higher in tumor tissues than in adjacent mucosa. In our study we evaluated the relationships among DNA damage, RTL and microbiota/fungi, as analysed in intestinal mucosa and CRC tumors. Conclusion: Colorectal cancer-associated dysbiotic microbiome differs between colon compartments, and certain genera, such as Fusobacterium, Campylobacter, Parvimonas and Selenomonas have potential to improve colorectal cancer detection.

Mutačný stav génu BRAF v melanómoch kože – prehľad problematiky a výsledky vlastnej štúdie

Autori: Bartoš V., Farkašová A., Janíková K.

Štuktúrovaný abstrakt: Gén BRAF je protoonkogén lokalizovaný na chromozóme 7, ktorého mutácie (najmä v pozícii V600) sú významne zahrnuté v karcinogéneze melanómu kože, ale aj iných malignít. Pacienti s kožnými melanómami s mutáciami génu BRAF V600 majú vo všeobecnosti horšiu prognózu a odlišujú sa od BRAF wild-type foriem viacerými klinicko-patologickými znakmi. Väčšinou sú lokalizované na trupe resp. na koži intermitentne vystavenej slnečnému žiareniu, vyskytujú sa skôr u mladších ľudí a histologicky pozostávajú najmä z povrchovo sa šíriaceho typu. Jednou z liečebných možností pre pacientov s neresekovateľnými a metastázujúcimi melanómami s mutáciou v géne BRAF je inhibícia BRAF kinázy, čo sa realizuje podávaním kombinácie BRAF a MEK inhibítorov. Pred tým je nutné z biopтической vzorky stanoviť mutačný stav génu BRAF v melanóme. Autori prezentujú vlastné výsledky hodnotenia 62 melanómov kože od 61 pacientov, u ktorých analyzovali mutačný stav génu BRAF metodikou polymerázovej reťazovej reakcie v nádorovom tkanive fixovanom vo formalíne a zaliatom do parafínových bločkov. Svoje výsledky porovnávajú s údajmi prezentovanými v literatúre a diskutujú o perspektívach problematiky pre potreby optimalizácie terapie v personalizovanej medicíne.

Chromozóm 3 u onkohematologických pacientov

Autori: Ferková Ľ., Hercegová A., Blahová A.

Štuktúrovaný abstrakt: Chromozóm 3 je v onkohematológii často súčasťou štruktúrových aj numerických chromozómových aberácií. Aberácie chromozómu 3 zahŕňajú dobre charakterizované rekurentné udalosti s jasne definovaným prognostickým významom, ako sú $inv(3)(q21q26)$ alebo $t(3;3)(q21;q26)$, ktoré sú typicky asociované s myeloidnými neopláziami a nepriaznivým klinickým priebehom. Okrem týchto častých zmien sa vyskytujú aj ďalšie translokácie s účasťou chromozómu 3, napríklad $t(1;3)$, $t(3;8)$, $t(3;11)$, ktoré sú hlásené len sporadicky.

Zatiaľ čo niektoré aberácie chromozómu 3 sú zahrnuté do súčasných klasifikačných a rizikových stratifikačných systémov, mnohé zriedkavé translokácie s účasťou chromozómu 3 zo-

stávajú neklasifikované a ich klinický a biologický význam je odvodený najmä z jednotlivých kazuistík alebo malých súborov pacientov. Tieto zriedkavé prestavby predstavujú významnú výzvu pre cytogenetickú interpretáciu, ako aj pre hodnotenie prognostického rizika v kažodennej onkohematologickej praxi.

V prednáške prezentujeme kazuistiky pacientov so zriedkavými translokáciami chromozómu 3 identifikovaných pri rutinnom cytogenetickom vyšetrení hematologických malignít. Využili sme konvenčnú cytogenetickú analýzu metódou G-pruhovania a na potvrdenie účasti chromozómu 3 a spresnenie lokalizácie zlomových bodov bola použitá fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH).

Cieľom bolo poukázať na význam zriedkavých translokácií chromozómu 3 v onkohematológii a na potrebu ich väčšieho zviditeľnenia a skúmania. Napriek nízkemu výskytu môžu tieto vzácne cytogenetické aberácie poskytovať dôležité informácie o biologických mechanizmoch ochorenia. Detailná cytogenetická a FISH charakterizácia je nevyhnutná pre správnu diagnostiku a môže prispieť k budúcemu spresneniu prognostickej stratifikácie v onkohematológii.

Molekulárna diagnostika II.

Klinický význam genomického profilovania v manažmente pacientov s nádormi neznámeho pôvodu

Autori: Svoboda M., Sýsová L., Krascsenitsová E., Lohajová Behúlová R.

Štuktúrovaný abstrakt: Klinický význam genomického profilovania v manažmente pacientov s nádormi neznámeho pôvodu Michal Svoboda¹, Lenka Sýsová¹, Eva Krascsenitsová¹, Regina Lohajová Behúlová¹ 1Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety Personalizovaná medicína výrazne mení diagnostiku a liečbu onkologických pacientov. Vychádza z molekulárno-genetického testovania, ktoré umožňuje zvoliť cieľnú a účinnú terapiu s minimom nežiaducich účinkov. Masívne paralelné sekvenovanie sa ku dnešnému dňu stalo súčasťou rutinného klinického procesu. Umožňuje nám vytvoriť komplexný genomický profil nádoru (CGP; Comprehensive Genomic Profiling) analýzou stoviek až tisícov génov a detekciou hlavných typov genomických alterácií. CGP má osobitý význam pri karcinómoch neznámeho primárneho pôvodu (CUP; Carcinoma of Unknown Primary). Ide o veľmi heterogénnu skupinu metastatických nádorov bez identifikovateľného primárneho ložiska v čase diagnózy. CUP tvoria približne 2–5% novodiagnostikovaných malignít, pričom sa často vyznačujú agresívnym biologickým správaním, rýchlou progresiou a nepriaznivou prognózou. Aj napriek pokrokom v zobrazovacích a imunohistochemických metódach zostáva presné určenie pôvodu nádoru v mnohých prípadoch neúspešné, čo výrazne obmedzuje možnosti liečby založenej na klasickej histologickej diagnostike. Využitie CGP nám umožňuje doplniť limity klasickej histopatologickej diagnostiky, uľahčiť diferenciálnu diagnostiku, definovať molekulárny profil nádoru a podporuje aj využitie tumor-agnostických terapií. Implementácia CGP pre pacientov s CUP tak predstavuje kľúčový nástroj modernej onkológie. Rozširuje diagnostické aj terapeutické možnosti a má potenciál pre zlepšenie manažmentu rôznych skupín onkologických pacientov.

Význam identifikácie vrodených mutácií u pacientov s hematoonkologickými ochoreniami

Autori: Purgatová A., Vallová S., Majerová E.

Štuktúrovaný abstrakt: V roku 2016 zaviedla WHO do svojej klasifikácie novú entitu, a to myeloidné neoplázie s germinálnou predispozíciou. S pribúdajúcimi dátami došlo k úprave názvu na hematologické neoplázie s germinálnou predispozíciou. Hoci väčšina myeloidných neoplázií vzniká sporadicky, genetická predispozícia je zodpovedná za minimálne 5–10 % prípadov. Jedinci so zárodočnou mutáciou majú zvýšené riziko vzniku myeloidných neop-

lázií, najmä akútnej myeloidnej leukémie (AML) a myelodysplastického syndrómu (MDS), ale aj lymfoidných malignít. Keďže somatické mutácie typické pre myeloidné neoplázie sa vyskytujú aj v predispozičných génoch, dochádza k častému prehliadaniu takýchto pacientov, najmä pri manifestácii ochorenia v dospelosti. Detekcia zárodočných mutácií má u pacientov zásadný klinický význam, keďže môže ovplyvniť manažment liečby, výber darcu pri alogénnej transplantácii, voľbu prípravného režimu, ale umožňuje aj zavedenie preventívnych opatrení či včasnú intervenciu. Pomáha tak predísť neúčinným alebo potenciálne škodlivým liečebným postupom, umožňuje genetické poradenstvo a sledovanie rizikových rodinných príslušníkov. V klinickej praxi ale stále chýbajú jednotné diagnostické kritériá a štandardizovaný algoritmus vyšetrenia. Prednáška poskytne prehľad aktuálnych diagnostických algoritmov odporúčaných pri diagnostike pacientov s podozrením na zárodočnú mutáciu u hematónkologických pacientov.

Projekt mapovania slovenského genómu - od dát k využitiu v praxi

Autori: Krumpolec P., Babišová K., Gnip A., Hadžega D., Hýblová M., Minárik G.

Štruktúrovaný abstrakt: Projekt mapovania slovenského genómu - od dát k využitiu v praxi

Úvod Jedným z hlavných cieľov Projektu mapovania slovenského genómu je identifikácia genetických variantov, ktoré sú jedinečné pre slovenskú populáciu alebo sa v nej vyskytujú so zvýšenou frekvenciou. Takýto prístup umožňuje odhaliť populačne špecifické genetické faktory, ktoré môžu súvisieť s výskytom ochorení a zdravotných stavov charakteristických pre populáciu Slovenska. Získané poznatky majú potenciál uplatnenia v oblasti genetického skríningu, prevencie a cielenej liečby, s dôrazom na princípy personalizovanej medicíny a podporu rozhodovania vo verejnom zdravotníctve. Metódy Prvá fáza projektu bola zameraná na analýzu genomických dát tzv. kontrolných kohort, teda zdravých jedincov slovenskej populácie. Identifikované genetické varianty boli anotované s využitím medzinárodnej databázy gnomAD a následne spracované do verejne prístupnej databázy genetických variantov slovenskej populácie. Databáza poskytuje prehľad o frekvenciách variantov v populácii a umožňuje ich porovnanie s inými populačnými zdrojmi. Výsledky a využitie databázy Predložená práca demonštruje praktické využitie verejne prístupnej databázy genetických variantov slovenskej populácie v klinicko-genetickom a výskumnom kontexte. Prezentované sú základné princípy práce s databázou, možnosti vyhľadávania genetických variantov a interpretácie ich populačných frekvencií v porovnaní s medzinárodnými referenčnými databázami. Databáza umožňuje efektívnejšie hodnotenie klinickej relevancie genetických nálezov, najmä pri rozlišovaní medzi zriedkavými patogénnymi variantmi a populačne špecifickými polymorfizmami. Predstavuje tak dôležitý nástroj na podporu interpretácie variantov v diagnostike, výskume aj populačných genetických analýzach a vytvára základ pre ďalšie rozširovanie projektu o nové kohorty a prepojenie s fenotypovými údajmi.

Od nejasnej hemolýzy ku genetickej diagnóze: dve kazuistiky deficitu glukóza-6-fosfát izomerázy

Autori: Katrincáková B., Grešíková M., Janečková L., Wachsmannová L., Hrčková G., Skalická K.

Štruktúrovaný abstrakt: Úvod: Deficit glukóza-6-fosfát izomerázy (GPI) je zriedkavá vrodená erytrocytová enzymopatia vedúca ku chronickej nesférocytovej hemolytickej anémii s variabilným klinickým priebehom (MIM:613470; ORPHA:712). V prípadoch nejasnej etiológie môže pretrvávajúca hemolýza viesť k potrebe opakovaných transfúzií erytrocytov a sekundárnemu preťaženiu organizmu železom. Molekulárno-genetické vyšetrenia založené na masívnom paralelnom sekvenovaní (MPS) zohrávajú kľúčovú úlohu v diferenciálnej diagnostike týchto stavov. Cieľ: Poukázať na význam MPS v diagnostickom algoritme hemolytických anémií nejasného pôvodu na príklade dvoch kazuistík. Pacienti a metódy: U prvého pacienta

bola od narodenia prítomná ťažká transfúzne závislá nesférocytová hemolytická anémia (22 transfúzií do veku 3 rokov). Druhý pacient bol novorodenec s prenatálne zachytenou ťažkou anémiou plodu, po intrauterinnej transfúzii a s potrebou opakovaných transfúzií po narodení. V oboch prípadoch prebehla veku primeraná diferenciálna diagnostika hemolytickej anémie; u prvého pacienta bola rozšírená o vylúčenie hemoglobínopatie, enzymologické vyšetrenia a hodnotenie metabolizmu železa. Pre pretrvávajúcu nejasnú etiológiu bolo indikované celoexómové sekvenovanie s analýzou virtuálneho panelu génov asociovaných s hereditárnymi hemolytickými anémiami. Výsledky: U oboch pacientov bol identifikovaný známy patogénny variant v géne GPI c.1414C>T (p.Arg472Cys) v homozygotnom stave. Segregačná analýza u prvého pacienta potvrdila autozómovo recesívnu dedičnosť; u druhého pacienta je vyšetrenie rodičov plánované v rámci ďalšieho klinického manažmentu. Záver: Naše kazuistiky demonštrujú prínos MPS pri objasnení genetickej príčiny inak nejasnej hemolytickej anémie, čo umožnilo stanoviť presnú diagnózu a prispelo k optimalizácii klinického manažmentu vrátane genetického poradenstva. Rekurentný výskyt variantu GPI c.1414C>T u dvoch nepríbuzných pacientov zo spádového regiónu Martin, referovaných do NÚDCH na špecializovanú diagnostiku, spolu s jeho predchádzajúcim popisom v česko-slovenskej populácii poukazuje na možnú zvýšenú prevalenciu tohto variantu v stredoeurópskom regióne. Tento nález zároveň zdôrazňuje klinický význam systematickej molekulárno-genetickej diagnostiky pri hemolytických anémiách nejasnej etiológie.

Testovanie vplyvu viacerých premenných na distribúciu skóre polygénového rizika pre zápalové črevné ochorenia

Autori: Minárik J., Lojová I., Kucharík M., Zaťková A., Budiš J., Szemes T., Radvánszky J.

Štruktúrovaný abstrakt: Úvod: Zápalové črevné ochorenia (IBD), zahŕňajúce ulceróznu kolitídu (UC), Crohnovu chorobu (CD) a indeterminovanú kolitídu, patria medzi chronické autoimunitné ochorenia s komplexnou multifaktoriálnou etiológiou. Zavádzanie personalizovaného prístupu v podobe genomických analýz, najmä skóre polygénového rizika (PRS) ponúka možnosť včasnej identifikácie jedincov s geneticou predispozíciou k týmto ochoreniam a potenciálnej stratifikácie pacientov na základe genetického rizika.

Metódy: Do analýzy bolo zaradených 806 jedincov, stredoeurópskeho pôvodu, rozdelených do dvoch hlavných skupín, t. j. testovacia skupina (138 jedincov) a validačná skupina (668 jedincov). V testovacej skupine 106 jedincov tvorilo kontrolnú skupinu, 17 UC pacientov, 10 CD pacientov a 5 pacientov s inými autoimunitnými ochoreniami (OAD). Validačná skupina pozostávala zo 481 kontrolných jedincov, 55 UC pacientov, 45 CD pacientov a 87 pacientov s inými autoimunitnými ochoreniami (OAD). Izolovaná DNA bola sekvenovaná pomocou WGS (platformy BGI a Illumina). PRS boli vypočítané pomocou neváhovej súčtovej metódy zahrnutím gVCF a zoznamu asociovaných SNV získaného z vyfiltrovaných GWAS (pre všetky populácie ako aj európsku populáciu). Pre štatistickú analýzu boli použité Kruskal-Wallis a Mann-Whitney U testy, spolu s hodnotením AUC pre posúdenie významnosti a diskriminačnej sily PRS.

Výsledky: Štatisticky najvýznamnejšie výsledky a najlepšia diskriminačná sila PRS boli pozorované pri vyššom počte jedincov (validačná skupina) a setov asociovaných SNV získaných zo všetkých GWAS ako aj jednej GWAS charakteristických pre európsku populáciu. Výpočty PRS pre UC a CD pacientov, pri porovnaní SNV pozícií filtrovaných pre fenotyp UC a CD, dosiahli nasledovné výsledky: všetky GWAS: AUCPRS-UC = 0.72, AUCPRS-CD = 0.73; jedna GWAS: AUCPRS-UC = 0.75, AUCPRS-CD = 0.78.

Záver: PRS sa ukazuje ako užitočný nástroj na stratifikáciu geneticky rizikových jedincov s IBD, pričom výsledky naznačujú, že zvýšenie počtu analyzovaných jedincov a populačno špecifický výber SNV významne zlepšujú jeho štatistickú významnosť aj diskriminačnú silu. Granty: APVV-24-0284, VEGA 2/0114/24, VEGA 2/0179/26.

Modelovanie časovo-priestorového vstupu SARS-CoV-2 do bunky pomocou VLP a gé-novo modifikovaných bunkových línií

Autori: Samec M., Lebrun S., Péčová R., Péč M., Gaudin R., Lučanský V.

Štuktúrovaný abstrakt: Časovo-priestorová dynamika vstupu SARS-CoV-2 do bunky predstavuje kľúčový aspekt vírusovej infekcie, ktorého podrobné pochopenie môže významne prispieť k objasneniu patogenézy ochorenia a zároveň vytvoriť predpoklady pre identifikáciu nových terapeutických cieľov. SARS-CoV-2, rovnako ako niektoré ďalšie koronavírusy, využíva na vstup do bunky receptor angiotensin-converting enzým 2 (ACE2), pričom proces vstupu je čiastočne závislý aj od aktivity serínovej proteázy TMPRSS2. Vstup koronavírusov do bunky je sprostredkovaný predovšetkým spike (S) proteínom, ktorý pozostáva z podjednotiek S1 a S2. Podjednotka S1 obsahuje receptor-viažucu doménu, zatiaľ čo podjednotka S2, ukotvená v obale vírusu, nesie fúzny peptid. Molekulové nástroje vytvorené v spolupráci so skupinou CNRS v Montpellier majú potenciál objasniť niektoré z kľúčových aspektov týchto procesov a priniesť nové, originálne poznatky o biológii SARS-CoV-2. Predstavený model je založený na použití lentivírusových vektorov, pomocou ktorých boli vytvorené bunkové línie produkujúce vírusom podobné partikuly SARS-CoV-2 (VLP). Tieto VLP nesú vybrané vírusové proteíny geneticky značené fluorescenčnými proteínmi (mRuby3 alebo mNeonGreen) a zároveň ALFA-tagom. Paralelne boli skonštruované geneticky modifikované recipientné bunky exprimujúce fluorescenčne značené nanobody špecificky interagujúce s ALFA-tagom. Po expozícii buniek fluorescenčne značeným VLP dochádza k špecifickej interakcii medzi ALFA-tagom a nanobody, čo vedie ku kolokalizácii dvoch odlišných fluorescenčných signálov. Táto kolokalizácia umožňuje analýzu časovo-priestorovej dynamiky interakcie vírus–bunka. V rámci vývoja modelu bolo testovaných viacero kombinácií fluorescenčne značených vírusových a bunkových proteínov. Charakterizácia jednotlivých komponentov bola realizovaná pomocou fluorescenčnej mikroskopie, prietokovej cytometrie a Western blot analýzy.