

Centrum neurověd LF MU/ Masaryk Neuroscience Hub

Neurovědní genetické a molekulární analýzy v konsorciu

M U N I
M E D



Workshop, 17.9.2020

Neurovědní genetické a molekulární analýzy v konsorciu

- **A – Metody molekulární neurobiologie**

(CEITEC MU – Výzkum mozku a lidské mysli, VS prof. Milana Brázdila)

- **B – CEITEC MU – genomická core facilitá – režim open access a genomický výzkum**

- **C – Spolupráce s průmyslem – BioVendor: vývoj certifikované molekulární diagnostiky**

Spolupráce prof. Roberta Mikulíka na vývoji inovativní diagnostiky CMP

A - Metody molekulární neurobiologie

- Pracoviště: **CEITEC MU – Výzkum mozku a lidské mysli**
- Skupina: **Behaviorální a sociální neurovědy**
- Vedoucí: **prof. MUDr. Milan Brázdil, Ph.D.**

Metody realizovány ve spolupráci s genomickou core facilitou CEITEC MU, výzkumnými skupinami Centra Molekulární medicína CEITEC MU a BU LF MU (viz dále):

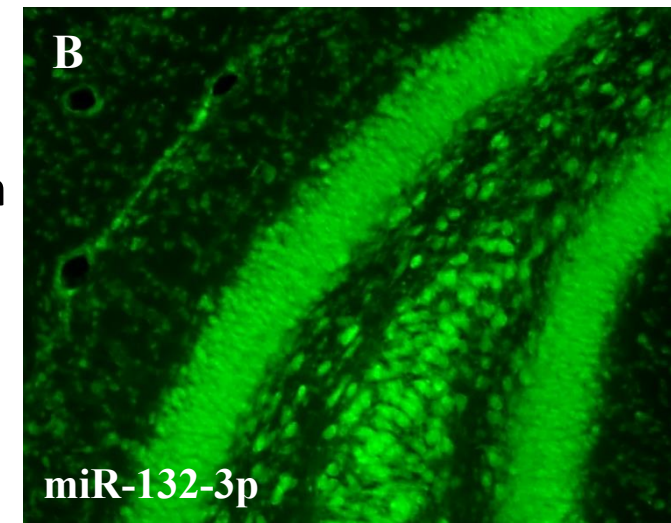
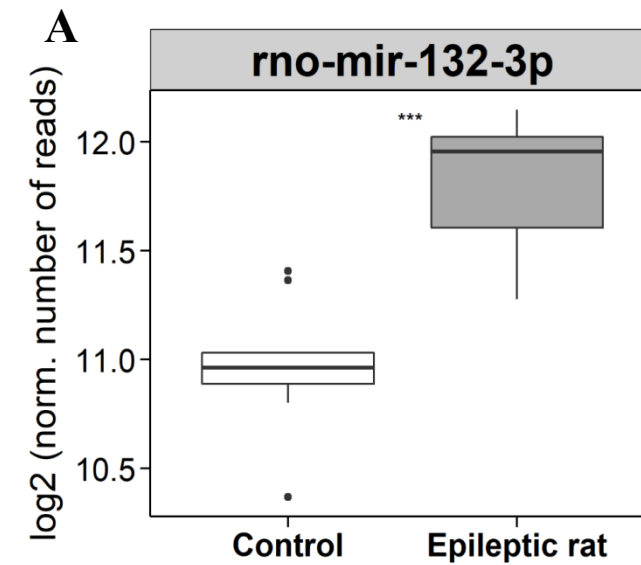
Analýzy molekul v buňkách, tkáních a tělních tekutinách:

- a) Identifikace a kvantifikace nukleových kyselin v buněčných/ tkáňových lyzátech a tělních tekutinách – **PCR, sekvenování (NGS)**
- b) Identifikace a lokalizace nukleových kyselin v buňkách a tkáních – **in situ hybridizace (ISH)**

Související publikace:

Bencurova P, et al. **MicroRNA and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: Whole miRNome profiling of human hippocampus.** *Epilepsia*. 2017; 58(10):1782–93. Rank: Q1

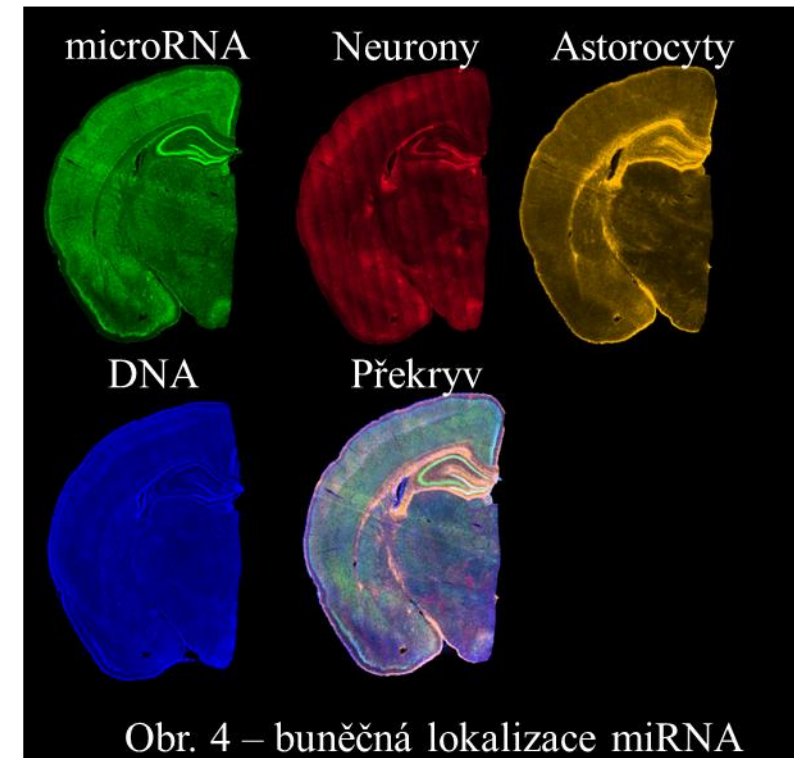
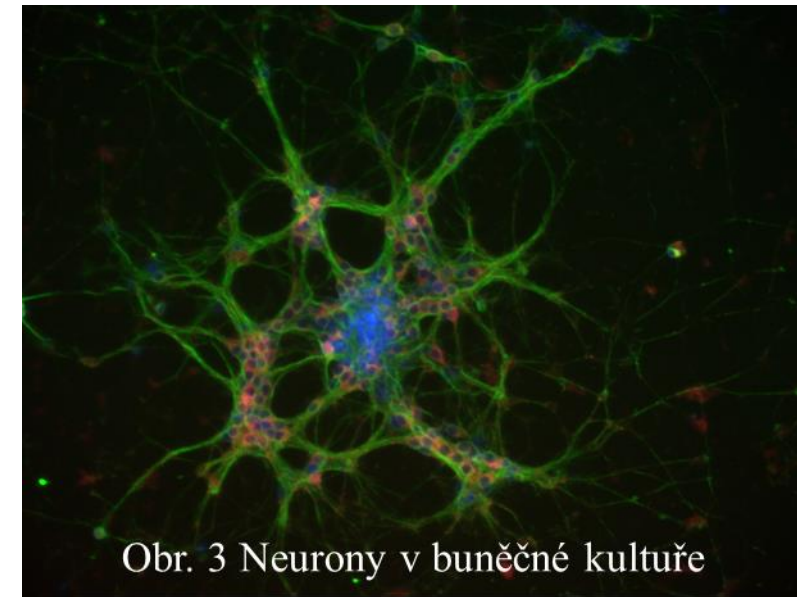
Baloun J, et al. **Epilepsy miRNA profile depends on the age of onset in humans and rats.** *Frontiers in Neuroscience*, Accepted August 11th 2020, Rank: Q2



Obr. 1 miR-132-3p v potkaním hipokampu: A NGS; B ISH

Molekulární metody v oblasti neurověd realizovány v laboratořích skupiny:

1. Buněčné kultury:
 - a) Příprava a kultivace **primárních neuronálních/** hipokampálních kultur z **potkaních** mozků
 - b) Kultivace a transfekce **lidských kontinuálních kultur** – HEK293
2. Analýzy molekul v buňkách, tkáních a tělních tekutinách:
 - a) Identifikace a lokalizace proteinů v buňkách a tkáních – **imunohistochemie**
 - b) Identifikace a kvantifikace proteinů v buněčných/ tkáňových lyzátech a tělních tekutinách – **western blot, ELISA**
3. Mikroskopie:
 - a) **Světelná, fluorescenční, konfokální** – zobrazování buněk a tkání od sub-celulární úrovně až po průřezy potkaním mozkem
 - b) **Stanovení elektrické aktivity neuronů** pomocí fluorescenčních barviv citlivých na změny potenciálů (probíhá optimalizace)



Spolupráce skupiny mimo CEITEC a LF MU:

- Fyziologický ústav AVČR – oddelení vývojové epileptologie – doc. Hana Kubová
 - Animální experimenty v oblasti epileptologie, testování chování, kognice, klasifikace záchvatů, EEG, příprava tkání pro molekulární analýzy, histologie
- Royal College of Surgeons Ireland (RCSI) – Prof David Henshall, Dr. Cristina Reschke
 - Expertíza v oblasti miRNA analýz v mozku – konzultace, pomoc s optimalizací metodiky, možná aktivní spolupráce na projektech

Kontaktní osoby :

- V případě zájmu o společné projekty: prof. MUDr. Milan Brázdil, Ph.D. (milan.brazdil@fnusa.cz)
- Konzultace metodiky a plánování molekulárních experimentů:

Mgr. Petra Bencúrová (petrabencurova@mail.muni.cz)

Mgr. Marie Kudličková Pešková, Ph.D. (252574@mail.muni.cz)

B - CEITEC MU – genomická core facilitata – režim open access a genomický výzkum

Centrální laboratoř Genomika (CFG) poskytuje služby v oblasti genomické analýzy a přístup k přístrojovému vybavení pro genomiku. K technologiím nabízeným centrální laboratoři patří

- masivně paralelní sekvenování (NGS) na přístrojích Illumina (2 x NextSeq 500, 2 x MiSeq)
- single-molecule nanoporové sekvenování
- DNA čipy (Affymetrix core)
- high-throughput & digitální PCR
- cell sorter, průtokové cytometry, laser capture microdissection.

Na genomickém neurovědním výzkumu v rámci Centra neurověd LF MU se podílí také

- Výzkumná skupina Marka Mráze (CEITEC MU) a
- Výzkumná skupina Ondřeje Slabého (CEITEC MU a Biologický ústav LF MU,

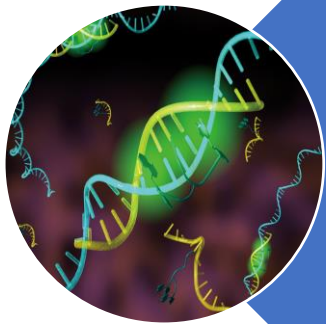
oslaby@med.muni.cz)

C - Spolupráce s průmyslem – BioVendor: vývoj certifikované molekulární diagnostiky

HLAVNÍ OBLASTI:

■ Biomarkery

- mikroRNA a další nekódující RNA (ncRNAs)
- Proteiny
- Vlastní výzkum diagnostických panelů
- Transfer nových biomarkerů do praxe



miRNA

- Length 19-23 nucleotides
- Short **non-coding** RNAs
- Post-transcriptional **regulators** of gene expression
- Involved in virtually all physiologic processes
- Involved in pathology of many diseases

■ Technologie

- Vývoj metod detekce proteinů a ncRNA
- Imunoassaye miREIA
- RT-qPCR metody
- ELISA soupravy
- CLIA automatizace
- Next Generation Sequencing (NGS)

S100B Human
ELISA

Glial Fibrillary Acidic
Protein Human ELISA
(GFAP)

Phosphorylated
Neurofilament H
Human ELISA

Wunderlich, M., et al. "Release of glial fibrillary acidic protein and protein S100B are related to the neurovascular status in acute ischaemic stroke." *Aktuelle Neurologie* 33.S 1 (2006): P434.

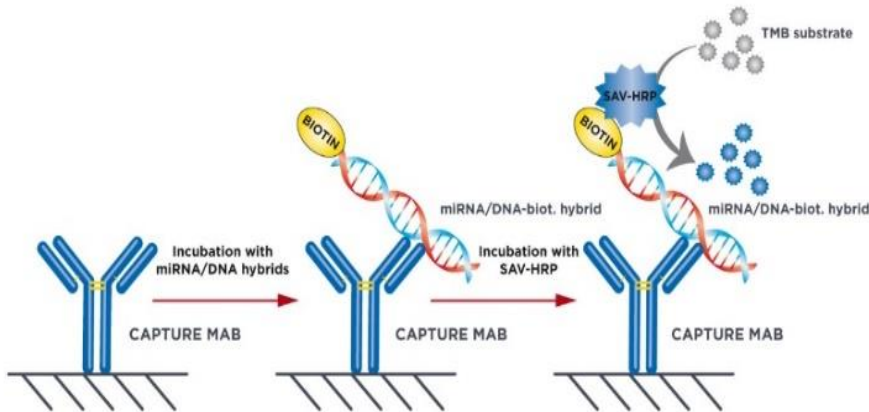
■ Servis

- Vývoj metod na zakázku
- Měření na zakázku

BIOVENDOR – METODY – MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

■ miREIA

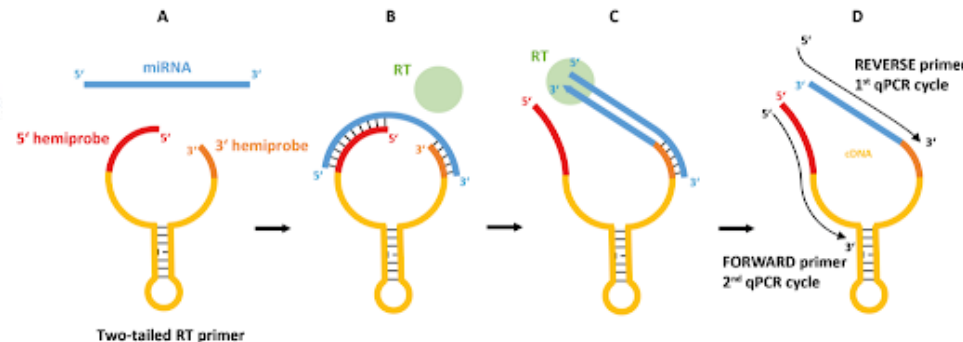
- „ELISA“ pro absolutní kvantifikaci miRNA (piRNA)
- Vhodná pro tkáně, buňky, buněčné linie



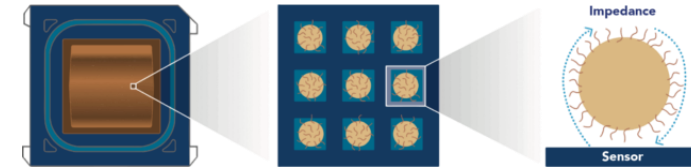
Krepelkova, Iveta, et al. "Evaluation of miRNA detection methods for the analytical characteristic necessary for clinical utilization." *Biotechniques* 66.6 (2019): 277-284.

■ RT-qPCR

- Knowledge panely (MIRXES) – měření až 352 cílových miRNA najednou
- Single qPCR miRNA assays
- **Two-tailed qPCR metoda pro detekci krátkých RNA**



Androvic, Peter, et al. "Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification." *Nucleic acids research* 45.15 (2017): e144-e144.



■ NGS

- Nová platforma od 9/2020 (Genapsys Sequencer)
- Amplikonové knihovny
- Mikrobiom

Esfandyarpour, Hesaam, et al. "High accuracy DNA sequencing on a small, scalable platform via electrical detection of single base incorporations." *Biorxiv* (2020): 604553.

SPOLUPRÁCE BIOVENDOR MIMO

Masaryk Neuroscience Hub

KONTAKT:

Martina Hložánková (hlozankova@biovendor.com)
Ředitelka divize BioVendor R&D

Joan Montaner (Španělsko)
Výzkum biomarkerů CMP



VASCage program (Rakousko)
Research Centre on Vascular Ageing and Stroke
www.vascage.at



RNADIAGON grant (USA, GER, ITA, ROU, AUT)
Výzkumné konsorcium pro oblast nekódujících RNA



...a další

Manuel Mayr (Velká Británie)
Výzkum miRNA v oblasti kardiovaskulárních onemocnění



Andreas Keller (Německo)
Chair for Clinical Bioinformatics (Výzkum miRNA, bioinformatika)



NEUROVĚDNÍ GENETICKÉ A MOLEKULÁRNÍ ANALÝZY V KONSORCIU – SOUHRN

Centrum neurověd LF MU/ Masaryk Neuroscience Hub
disponuje dostatečným infrastrukturním zázemím umožňujícím moderní neurobiologický, genomický a molekulární výzkum v oblasti neurověd.

V této oblasti již vznikla **řada prioritních odborných publikací**, především v oblasti výzkumu epilepsie, a byla navázána **úspěšná spolupráce s průmyslem** (inovativní diagnostika CMP) prospektivně umožňující transfer získaných poznatků do klinické praxe.