

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE**



# **REVOGENE – Výskumné centrum molekulárnej genetiky**

**ITMS: 26240220067**

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





## ○ Druh projektu:

- projekt v rámci Transferu technológií
- partnerstvo so súkromným subjektom Geneton s.r.o.

## ○ Žiadateľ projektu:

Geneton s.r.o.

[www.geneton.sk](http://www.geneton.sk)



## ○ Zodpovedný riešiteľ partnera projektu a názov príslušnej fakulty:

- prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.
- Prírodovedecká fakulta UK

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



**Európska únia**  
Európsky fond regionálneho rozvoja





## Hlavný zámer/ciele projektu:

- Realizácia špičkového aplikovaného výskumu v oblasti molekulárnej genetiky a posilnenie spoločnej výskumnej základne podnikateľskej a akademickej sféry.
- Vytvorenie spoločného centra pre priemyselný výskum novej generácie sekvenovania a jeho vybavenie nevyhnutnou výskumnou infraštruktúrou.
- Priemyselný výskum novej generácie sekvenovania v molekulárnej medicíne so zameraním na genomiku, exomiku, transkriptomiku a metagenomiku.

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





## Stručná anotácia projektu:

- Cieľom projektu je vytvorenie výskumného centra molekulárnej genetiky - REVOGENE, ktoré umožní realizovať výskum v oblasti novej generácie sekvenovania (Next-Generation Sequencing – NGS). Výsledky tohto výskumu bude možné využiť napr. v klinickej genetike, mikrobiológii a virológii, neonatológii, onkológii, farmakológii, transplantológii, patológii a mnohých ďalších.
- Projekt a vytvorené výskumné centrum umožnia realizovať aplikovaný výskum medzinárodnej kvality v oblasti molekulárnej genetiky v prepojení na oblasť biotechnológií, progresívnych materiálov a znalostných technológií s podporou IKT.
- Priamym výstupom projektu budú nové metódy a postupy NGS sekvenovania genómov, exómov, transkriptómov a metagenómov so zameraním na molekulárnu medicínu, ktoré umožnia využiť získané poznatky v špecializovanej molekulárno-genetickej diagnostike.

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







## Spôsob riešenia projektu:

- Dva základné špecifické ciele budú realizované prostredníctvom troch aktivít:  
v rámci 1. špecifického cieľa:
  - 1. aktivita - Vytvorenie centra výskumu NGS, stanovenie pravidiel spoločnej spolupráce a diseminácia výsledkov jeho činnosti
  - 2. aktivita - Obstaranie nevyhnutnej infraštruktúryv rámci 2. špecifického cieľa
  - 3. aktivita - Priemyselný výskum metód NGS v molekulárnej genetike.
- V rámci projektu bude prebiehať výskum metód NGS v molekulárnej genetike, so zameraním na tieto oblasti:
  - Resekvenovanie ľudského genómu
  - Analýza amplicónov
  - Analýza kompletných exómov
  - Komparatívna transkriptomika pri výskume najčastejších rakovinových ochorení
  - Analýza komplexných vzoriek – metagenomika.
- Po organizačnej stránke bol dôraz kladený na to, aby na projekte participovali kvalitní odborníci žiadateľa a partnera.

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





# Sekvenovanie novej generácie

- masívne paralelné sekvenovanie – technológie schopné čítať obrovské množstvo náhodných fragmentov DNA v jedinom cykle analýzy
- umožňuje:
  - osekvenovanie celých genómov (*de novo*)
  - získať kompletný obraz o génovej expresii
  - kompletnú analýzu enviromentálnych vzoriek (napr. populácia baktérií v čreve)
  - exómové sekvenovanie
  - cielené sekvenovanie (mutačný status)
  - komparatívna genomika
  - cancer genotyping ( histopatológia)

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



# Obstarané unikátne prístroje: GS Junior 454 Roche

- Princíp: pyrosekvenovanie
- Mini verzia GS FLX systému
- Parametre:
  - Kapacita: 35 mil báz / 1 run
  - Priemerná dĺžka čítania: 400bp
  - Počet čítaní: 0,8Gb / 1 run
  - Chybovosť: 1%
  - Vstupný materiál: gDNA, cDNA, amplicóny, BACs
- Aplikácie:
  - De novo sekvenovanie – vírusy, baktérie, huby s menším genómom
  - Cílené sekvenovanie
  - Metagenomika



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





## Illumina - MiSeq

- **Princíp:** cloned single-molecule array (klastre), sekvenovanie syntézou – značené dNTP s reverzibilnými terminátormi
- **Parametre:**
  - vysoká kapacita
  - dĺžka čítania: 250bp obojstranne
  - počet čítaní: 7 Gb / 1run
  - chybovosť: 0,1%
  - čas: 1 deň (5min/cyklus)
- **Aplikácie:**
  - **cielené sekvenovanie:**
    - Sekvenovanie amplikónov
    - Clone checking
    - 16S metagenomika
  - **sekvenovanie menších genómov:**
    - *De novo* sekvenovanie
    - Resekvenovanie
    - Plazmidy
  - **RNA sekvenovanie**
  - **Vhodné aj pre homopolymérne oblasti**



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





## Ion Torrent PGM

- **Princíp:** cyklické pridávanie nukleotidu a zaznamenávanie zmeny pH ( $H^+$ )
- **Chip :** 11 mil. jamiek (318)
- **Parametre:**
  - Dĺžka čítania: 200-300 bp (2 hod)
  - Výťažok: 1 Gb
  - Chybovosť: 1%
- **Aplikácie:**
  - *De novo* & resekvenovanie genómov baktérií a vírusov
  - Cílené sekvenovanie
  - Exómové sekvenovanie
  - Mitochondriálne sekvenovanie
  - RNA sekvenovanie
  - Chromatin immunoprecipitation seq (organizácia chromatínu, jeho úloha v regulácii transkripcii v bio. procesoch a pri ochoreniach)



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





## Dosiahnuté výsledky v projekte:

- V rámci aktivity 1.1 bola podpísaná Zmluva o spolupráci a spoločnom pracovisku. Informácie o projekte boli odvysielané televíznou stanicou STV2 v relácii Spektrum vedy – Molekulárna biológia. V apríli 2013 prebehlo verejné otvorenie Výskumného centra molekulárnej genetiky a prezentácia práce so zakúpenými prístrojmi projektu za účasti médií. Správa o otvorení centra a jeho prínose pre výskum v molekulárnej genetike na Slovensku bola uverejnená vo viacerých verejných médiách. Výsledky projektu boli prezentované na podujatiach pre verejnosť Týždeň vedy a techniky na Slovensku 2012 a 2013 a Noc výskumníkov 2013. Riadiaci orgán centra – vedecká rada - na svojich pravidelných stretnutiach po získaní skúseností s budovaním a chodom nových laboratórií postupne vypracoval materiály o dlhodobých cieľoch centra a spôsobe ich realizácie.
- V rámci aktivity 1.2 boli obstarané a dodané všetky plánované prístroje, prebehla ich inštalácia a pilotná skúšobná prevádzka celej infraštruktúry Výskumného centra. Aktivita bola v marci 2013 úspešne ukončená.

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





## Dosiahnuté výsledky v projekte:

- **V rámci aktivity 2.1** prebieha zber a archivácia DNA vzoriek pacientov potenciálne využiteľných na NGS a sekvenačné analýzy na NGS (next-gen sequencing) prístrojoch:
  - Práce, ktorých cieľom bolo zistiť kompletnú sekvenciu Hanta vírusov. Taktiež sme sa snažili osekvenovať fetálnu DNA z plazmy tehotných žien a odlíšiť ju od tej maternálnej.
  - Spracovanie ľudských DNA vzoriek izolovaných z krvi, bunkových kultúr, environmentálnych vzoriek, do formy DNA knižníc pre sekvenovanie prostredníctvom prístroja pre next-gen sekvenovanie
  - Zabehnutie sekvenačných metodík pre prístroj Sekvenačný systém novej generácie a Automat na spracovanie vzoriek, a to pre sekvenovanie malých genómov, metagenomické analýzy.
  - Optimalizácia prípravy a spracovania bakteriálnej DNA získanej z celkovej izolácie DNA z metagenomických vzoriek, spracovanie vzorky arena vírusu a ich next gen sekvenovanie. Next-gen sekvenovanie mikrobiómu. Riešenie amplifikácie 16S rDNA metagenomických vzoriek získaných ako súčasť izolácie celkovej DNA z biopsie čreva pacientov s ulceróznou kolitídou a Crohnovou chorobou a spracovanie vzoriek za účelom stanovenia zloženia mikrobiómu čreva.
  - Sekvenovanie a analýza cirkulujúcej fetálnej DNA získanej z plazmy tehotných žien.
  - Štúdium hluchoty: príprava DNA knižnice (vzorky DNA mačiek z imbrednej línie bielych modrookých hluchých mačiek boli izolované z ich krvi alebo zo srsti) NGS sekvenovanie a jeho primárna analýza. Príprava knižnice krátkych RNA zo vzoriek microRNA, ktoré boli izolované z plaziem tehotných žien.

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







## Dosiahnuté výsledky v projekte:

- Výsledky projektu boli prezentované na konferencii v Martine 3rd Central-Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis, apríli 2014:
  - Comparing performance of small NGS platforms in non-invasive aneuploidy screening test. Szemes T, Hyblova M, Minarik G, Vlkova B, Celec P, Strieskova L, Soltys K, Bokorova S, Sysak R, Gerykova-Bujalkova M, Budis J.
  - Prenatal trisomy testing on IonTorrent PGM. Minarik G, Repiska G, Nagyova E, Soltys K, Budis J, Sysak R, Gerykova-Bujalkova M, Vlkova-Izrael B, Szemes T, Hudecova I, Porubsky D, Schuring-Blom GH, van Kempen MJA, Elferink M, de Bruijn E, Page-Christiaens GCML, Nijman IJ, Ploos van Amstel HK, Cuppen E, van Haafen G.
- a na medzinárodnej vedeckej konferencii v Miláne v Taliansku The European Human Genetics Conference 2014, máj-jún 2014
  - Feasibility of utilization of semiconductor based low coverage genomic sequencing in noninvasive prenatal trisomy 21 detection. G. Repiska, E. Nagyova, K. Soltysova, J. Budis, R. Sysak, M. Gerykova-Bujalkova, B. Vlkova-Izrael, T. Szemes, G. Minarik, I. Hudecova, D. Porubsky, H. G. Schuring-Blom, M. J.A. van Kempen, M. Elferink, E. de Bruijn, G. C.M.L. Page-Christiaens, I. J. Nijman, H. K. P. van Amstel, E. Kuppen, G. van Haaften
  - Performance of in-house non-invasive aneuploidy test using benchtop next generation sequencing system. M. Hýblová, G. Minárik, R. Sysák, M. Geryková-Bujalková, B. Vlková2 L. Striešková, J. Budiš, S. Bokorova, J. Turňa, T. Szemes
  - Comprehensive genetic diagnosis of non-syndromic hereditary hearing loss by targeted resequencing of 32 genes with use of Haloplex design and IonTorrent PGM sequencer. E. Nagyova, D. Dvorska, T. Szemes, L. Kadasi, G. Minarik

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







## Výhľad ďalšieho postupu riešenia projektu v nasledujúcom období

- V rámci aktivity 1.1 riadiaci orgán centra – vedecká rada – bude naďalej na svojich pravidelných stretnutiach zabezpečovať fungovanie centra a riadenie prezentácie výsledkov výskumu realizovaného v rámci projektu a propagáciu centra navonok na domácich a zahraničných konferenciách ako aj smerom k laickej verejnosti.
- V rámci aktivity 2.1 bude pomocou zakúpeného prístrojového vybavenia pre NGS prebiehať príprava knižníc, NGS analýzy fragmentových a RNA vzoriek periférnej krvi tehotných žien na výskum fenoménov fetálnej DNA, bioinformatické spracovanie dát a interpretácia, verifikačné experimenty a príprava odborných publikačných výstupov

