

Sequenzierung

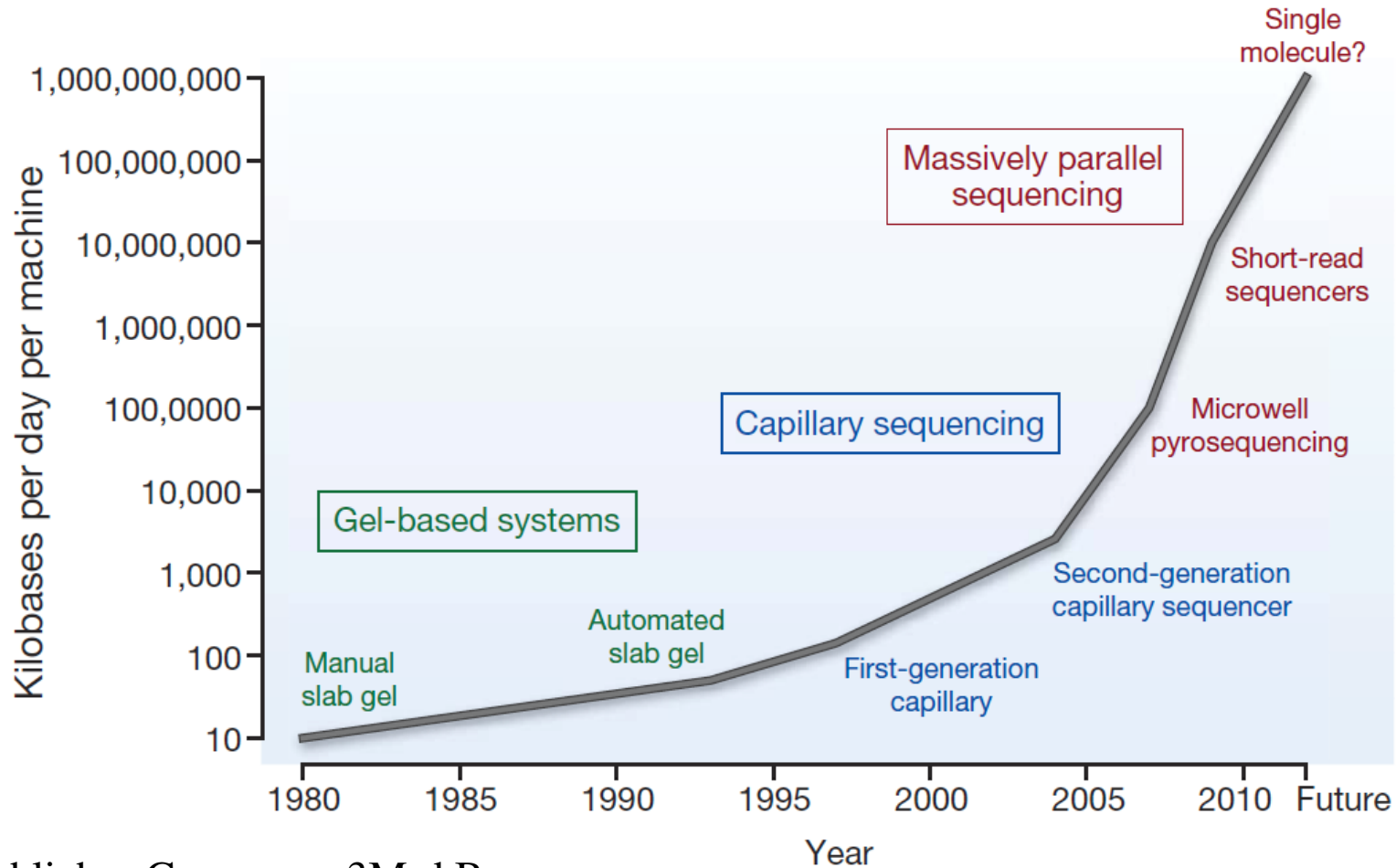
Norbert Arnold



Neue Sequenziertechnologien (seit 2005)

- Next Generation Sequenzierung (NGS, Erste Generation)
 - Unterschiedliche Plattformen mit unterschiedlichen Strategien
 - Roche 454 (basierend auf Pyrosequenzierungstechnik)
 - Illumina Genome Analyser (Reversible Dye Terminatoren)
 - Applied Biosystems Solid (Sequenzierung durch Ligation)
- Sequenzierer der zweiten und dritten Generation
 - führen zu
 - Verringerung der Analysezeiten
 - Kostenreduktion
 - Rationalisierung der Probenaufarbeitung
 - durch
 - Einzelmolekülsequenzierung (VisiGen; Pacific Bioscience)
 - Echtzeit Einzelmolekülsequenzierung mittels Nanoporetechnologie (Oxford Nanopore Technologies)
 - Mikrofluid und Nanotechnologie

Tägliche Sequenzierkapazität



Menschliches Genom ca. 3Mrd Bp

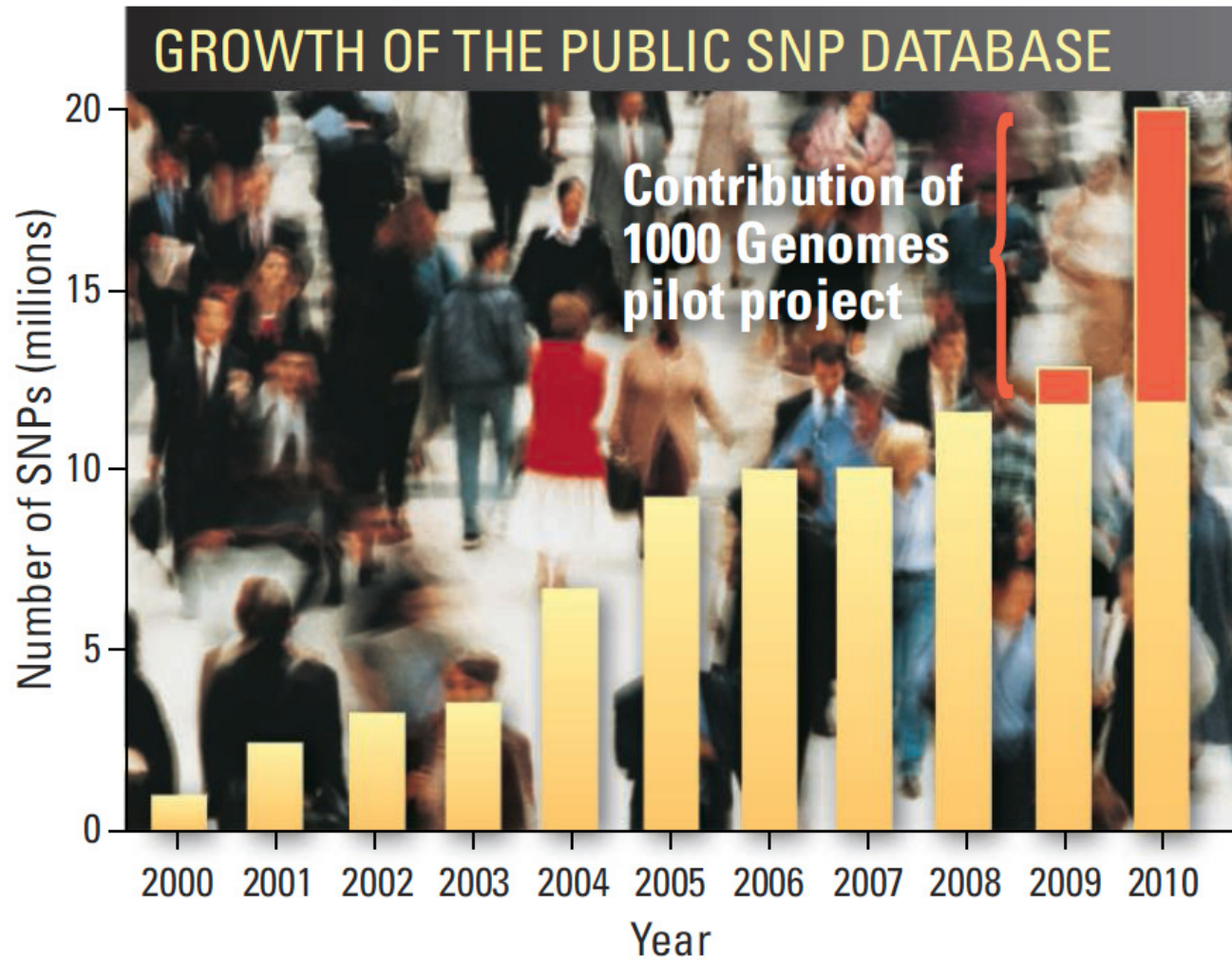
Stratton M. et al. Nature 458:719-724 (2009)

→ Dept. Gynecology and Obstetrics
Oncology Laboratory



Anwendungsgebiete der NGS-Technik

- **Genomanalyse**
 - Analyse tausender Genome in den nächsten Jahren (www.1000genomes.org; Beginn 2008) > Erste Ergebnisse jetzt veröffentlicht
 - 250-300 genetische Abweichungen mit Einfluss auf Proteinfunktionalität
 - Ca. 50-100 mit bekannten Erbkrankheiten assoziiert
 - Mindestens 11 Mio SNPs, ca. 1 Mio InsDels und 20.000 größere strukturelle Veränderungen
 - Eltern-Kind-Paar: Töchter 60 neue Mutationen
- **Targeted Resequencing**
 - Sequenzierung spezifischer Regionen durch vorherige Anreicherung
- **Exome-Sequencing**
- **Transkriptomsequenzierung**
 - Kartierung und Quantifizierung von biologischen Transkripten (RNA-seq)
- **DNA bindende Proteine und Chromatinanalyse**
 - Immunopräzipitierte DNA wird in eine NGS Bibliothek umgeschrieben (ChIP-Seq)



Pennisi E Science 330:574-575 (2010)

 Dept. Gynecology and Obstetrics
Oncology Laboratory



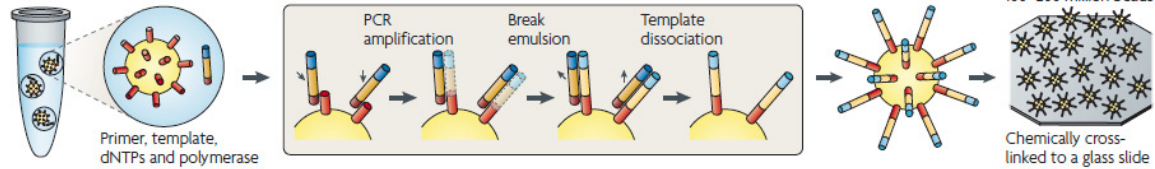
Generierung der Sequenziervorlage

- Einzelmolekül-Templates Vorteile gegenüber klonaler Amplifikation
 - Geringe DNA-Menge (<1µg)
 - Keine vorgeschaltete PCR-Reaktion
 - keine PCR-bedingte Veränderungen
 - Verringerung eines Amplifikationsbias in der Produktausbeute durch AT- oder GC-reiche Zielbereiche
 - Bessere Quantifizierung bei RNA-Sequenzierung
- Klonale Amplifikation z.B. bei Roche 454, Illumina
- Einzelmolekül-Anwendung z.B. bei Helicos BioSciences; Pacific Biosciences



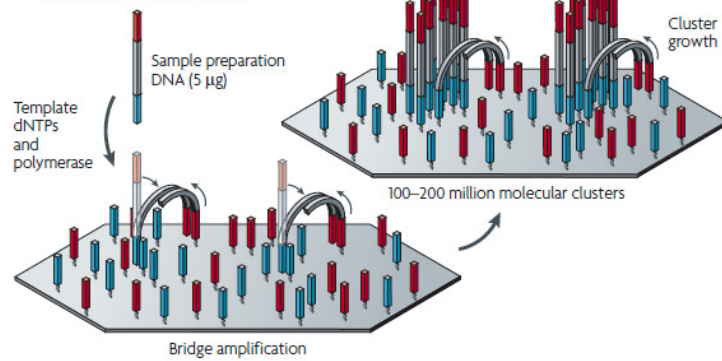
**a Roche/454, Life/APG, Polonator
Emulsion PCR**

One DNA molecule per bead. Clonal amplification to thousands of copies occurs in microreactors in an emulsion

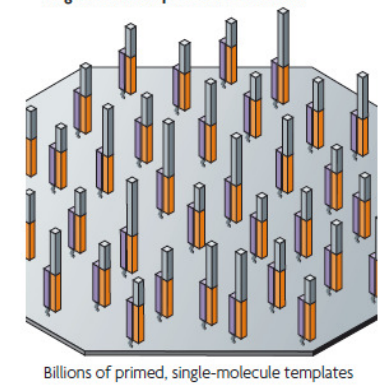


**b Illumina/Solexa
Solid-phase amplification**

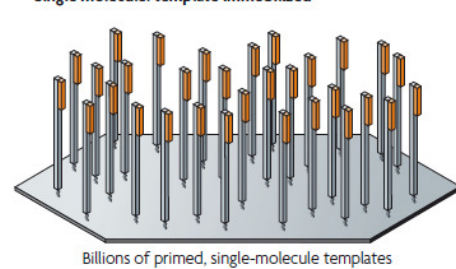
One DNA molecule per cluster



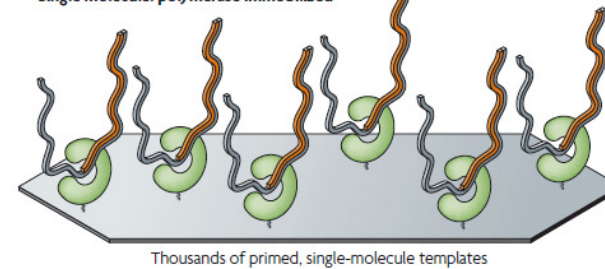
**c Helicos BioSciences: one-pass sequencing
Single molecule: primer immobilized**



**d Helicos BioSciences: two-pass sequencing
Single molecule: template immobilized**



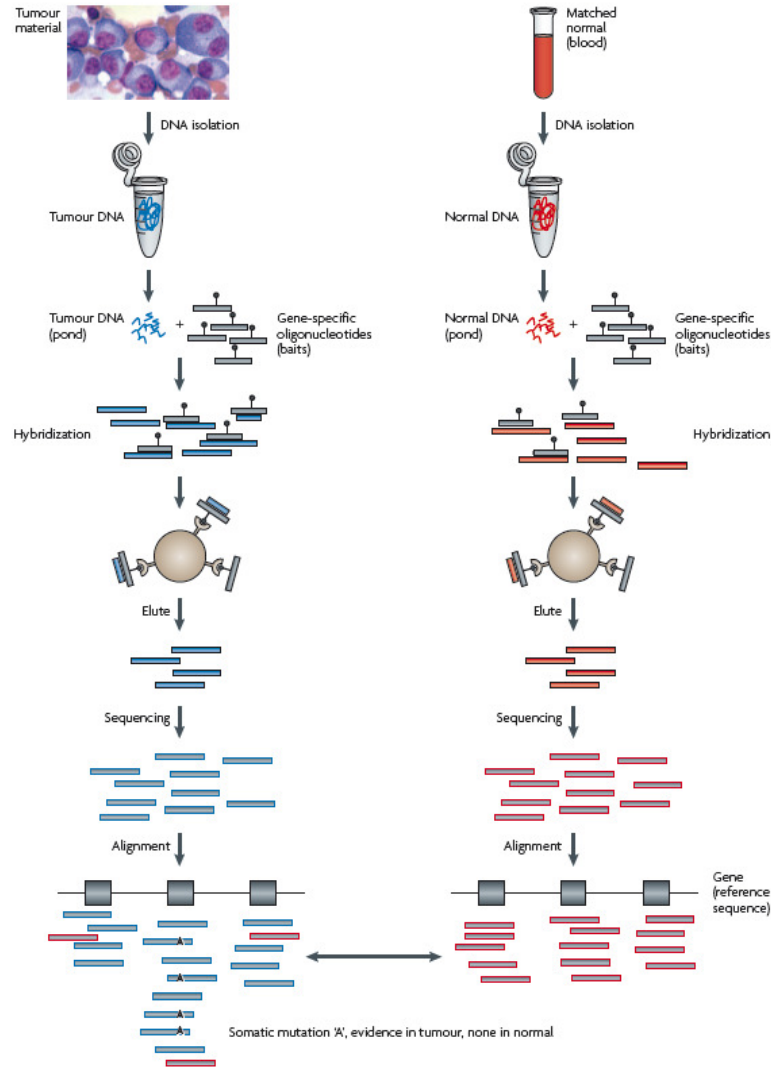
**e Pacific Biosciences, Life/Visigen, LI-COR Biosciences
Single molecule: polymerase immobilized**



Persönliche Genomsequenzierungsprojekte

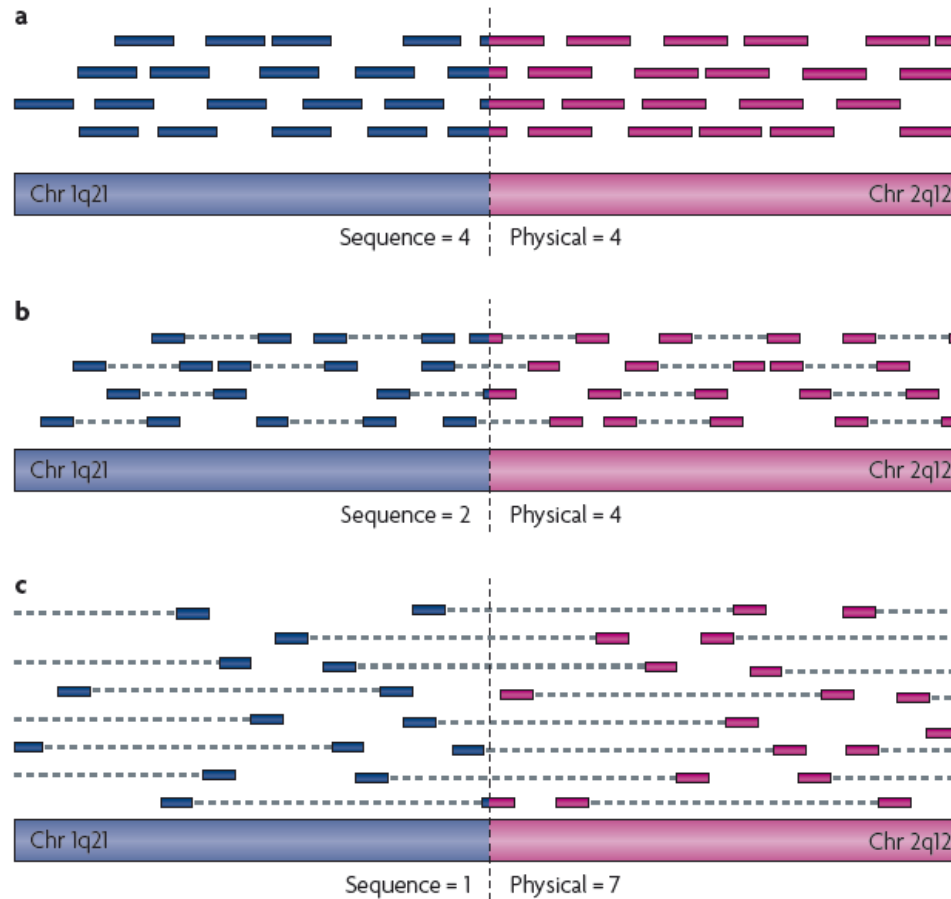


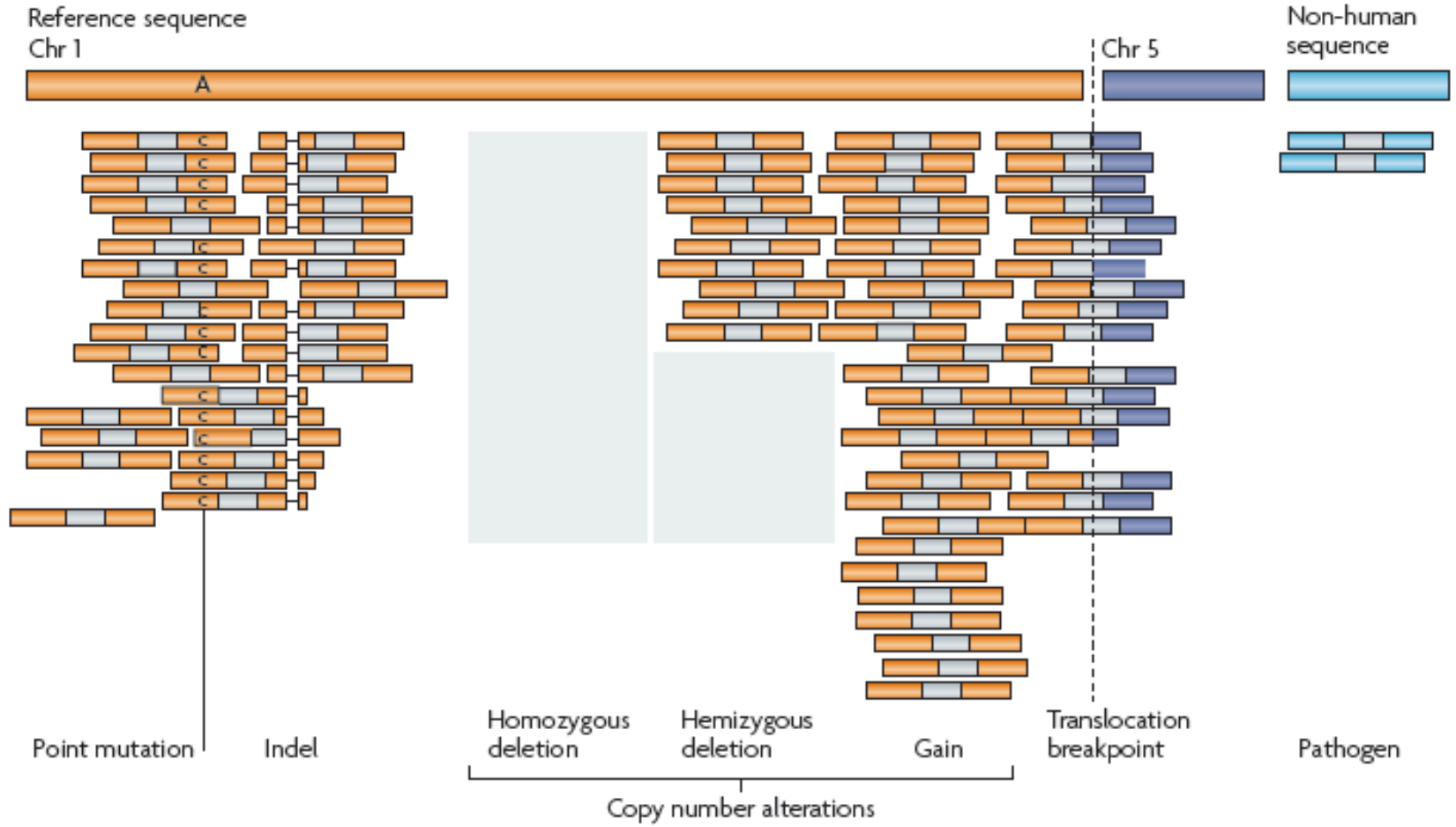
Persönliches Genom	Benutzte Plattform	SNV in Millionen	Anzahl Läufe	Geschätzte Kosten (\$)
Humanes Genom Projekt (versch. Personen)	Sanger	NA	NA	300 Millionen
J. Craig Venter	Sanger	3.21	>340Tsd	70 Millionen
James D. Watson	Roche 454	3.32	234	1 Million
Männlicher Koreaner	Illumina/ Solexa	3.45	30	200.000
Stephen R. Quake	Helicos Bio Science	2.81	4	48.000



Strategie zur Sequenzierung spezifischer Regionen oder Exome-Sequencing

Tiefe der Abdeckung





Meyerson M. et al. Nat Rev Genet 11:685-696 (2010)

→ **Dept. Gynecology and Obstetrics
Oncology Laboratory**



Anwendung der NGS in der Klinik

- Schlüsselpunkte für den Transfer sind
 - Probenaufbereitung
 - Robustheit der Technologie
 - Massive Kostenreduktion (Anschaffung und Einzelanalyse)
 - Entwicklung bioinformatischer Algorithmen zur Handhabung der Daten
 - Interpretation der gefundenen Veränderungen (20.000-30.000 in einer Tumorprobe)
- Anwendungsgebiete
 - Präimplantationsdiagnostik
 - Pränataldiagnostik (Fetale Chromosomen Aneuploidie)
 - Tumorcharakterisierung

Größte Herausforderung der Zukunft:

Aus dem Berg an Daten einen biologischen Sinn zu extrahieren