



UNIVERSITÄTS**medizin.**

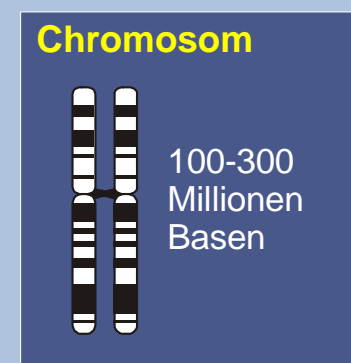
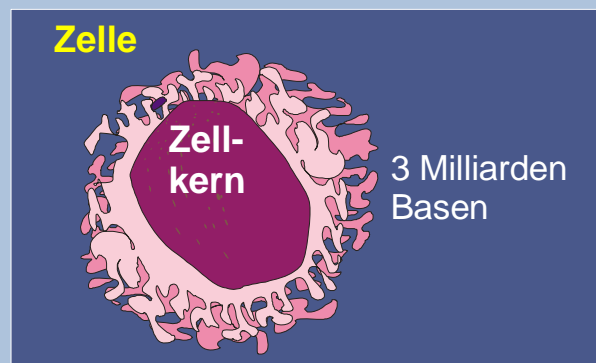
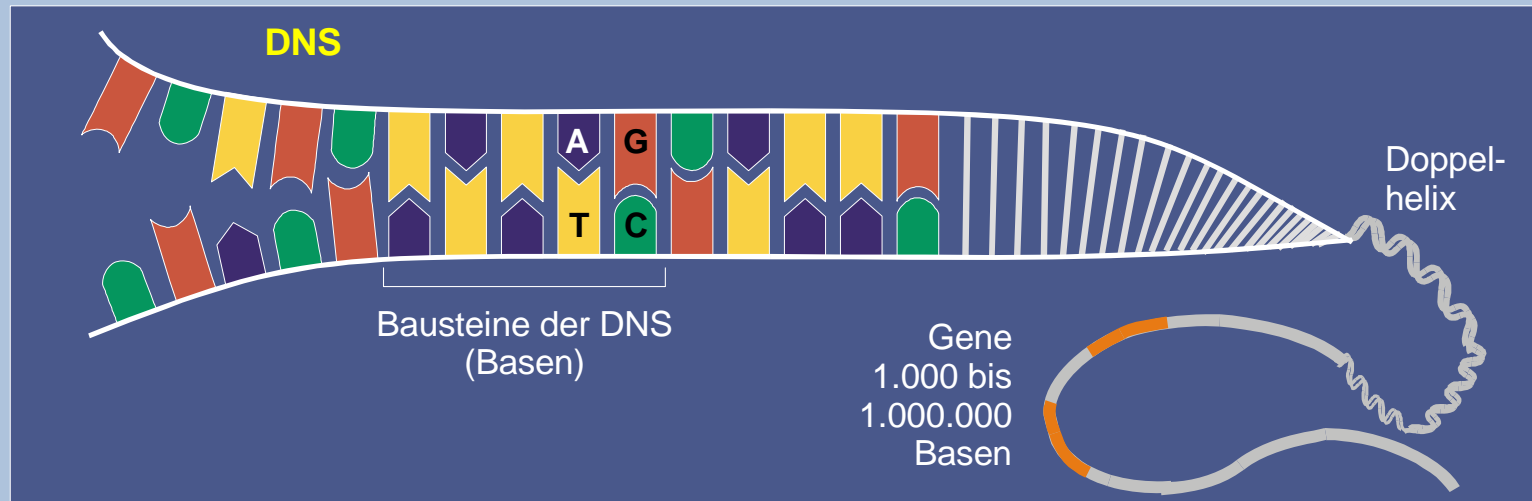
MAINZ

**Wissenschaftlich-technische Entwicklungen im Bereich  
der Multiplex- und High-Throughput-Diagnostik**

Karl J. Lackner

- Hochdurchsatzverfahren in der molekularen bzw. genetischen Diagnostik
- Next Generation-Sequenzierung von Nukleinsäuren

# Aufbau des Genoms



# Entwicklung der DNA-Sequenzierung

- 1980er – Maxam-Gilbert und Sanger
  - $1-5 \times 10^3$  Basen/Tag und System
- 1990er – Kapillarsequenzierung mit Fluoreszenzfarbstoffen
  - $5 \times 10^4 - 10^5$  Basen/Tag und System

# 2005 – Next generation-Sequenzierung

nature

Vol 437|15 September 2005|doi:10.1038/nature03959

## ARTICLES

### Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors

Marcel Margulies<sup>1\*</sup>, Michael Egholm<sup>1\*</sup>, William E. Altman<sup>1</sup>, Said Attiya<sup>1</sup>, Joel S. Bader<sup>1</sup>, Lisa A. Bembien<sup>1</sup>, Jan Berka<sup>1</sup>, Michael S. Braverman<sup>1</sup>, Yi-Ju Chen<sup>1</sup>, Zhoutao Chen<sup>1</sup>, Scott B. Dewell<sup>1</sup>, Lei Du<sup>1</sup>, Joseph M. Fierro<sup>1</sup>, Xavier V. Gomes<sup>1</sup>, Brian C. Godwin<sup>1</sup>, Wen He<sup>1</sup>, Scott Helgesen<sup>1</sup>, Chun He Ho<sup>1</sup>, Gerard P. Irzyk<sup>1</sup>, Szilveszter C. Jando<sup>1</sup>, Maria L. I. Alenquer<sup>1</sup>, Thomas P. Jarvie<sup>1</sup>, Kshama B. Jirage<sup>1</sup>, Jong-Bum Kim<sup>1</sup>, James R. Knight<sup>1</sup>, Janna R. Lanza<sup>1</sup>, John H. Leamon<sup>1</sup>, Steven M. Lefkowitz<sup>1</sup>, Ming Lei<sup>1</sup>, Jing Li<sup>1</sup>, Kenton L. Lohman<sup>1</sup>, Hong Lu<sup>1</sup>, Vinod B. Makhijani<sup>1</sup>, Keith E. McDade<sup>1</sup>, Michael P. McKenna<sup>1</sup>, Eugene W. Myers<sup>2</sup>, Elizabeth Nickerson<sup>1</sup>, John R. Nobile<sup>1</sup>, Ramona Plant<sup>1</sup>, Bernard P. Puc<sup>1</sup>, Michael T. Ronan<sup>1</sup>, George T. Roth<sup>1</sup>, Gary J. Sarkis<sup>1</sup>, Jan Fredrik Simons<sup>1</sup>, John W. Simpson<sup>1</sup>, Maithreyan Srinivasan<sup>1</sup>, Karrie R. Tartaro<sup>1</sup>, Alexander Tomasz<sup>3</sup>, Kari A. Vogt<sup>1</sup>, Greg A. Volkmer<sup>1</sup>, Shally H. Wang<sup>1</sup>, Yong Wang<sup>1</sup>, Michael P. Weiner<sup>4</sup>, Pengguang Yu<sup>1</sup>, Richard F. Begley<sup>1</sup> & Jonathan M. Rothberg<sup>1</sup>

# 2005 – Next generation-Sequenzierung

nature

Vol 452 | 17 April 2008 | doi:10.1038/nature06884

## LETTERS

---

### **The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing**

David A. Wheeler<sup>1\*</sup>, Maithreyan Srinivasan<sup>2\*</sup>, Michael Egholm<sup>2\*</sup>, Yufeng Shen<sup>1\*</sup>, Lei Chen<sup>1</sup>, Amy McGuire<sup>3</sup>, Wen He<sup>2</sup>, Yi-Ju Chen<sup>2</sup>, Vinod Makhijani<sup>2</sup>, G. Thomas Roth<sup>2</sup>, Xavier Gomes<sup>2</sup>, Karrie Tartaro<sup>2†</sup>, Faheem Niazi<sup>2</sup>, Cynthia L. Turcotte<sup>2</sup>, Gerard P. Irzyk<sup>2</sup>, James R. Lupski<sup>4,5,6</sup>, Craig Chinault<sup>4</sup>, Xing-zhi Song<sup>1</sup>, Yue Liu<sup>1</sup>, Ye Yuan<sup>1</sup>, Lynne Nazareth<sup>1</sup>, Xiang Qin<sup>1</sup>, Donna M. Muzny<sup>1</sup>, Marcel Margulies<sup>2</sup>, George M. Weinstock<sup>1,4</sup>, Richard A. Gibbs<sup>1,4</sup> & Jonathan M. Rothberg<sup>2†</sup>

## Konzept der Hochdurchsatz-Sequenzierung

- Miniaturisierung und Optimierung bekannter Technologien
- Hoch-parallele Durchführung der individuellen Sequenzierreaktionen
- Kurze, zufällig generierte Sequenzfragmente (ca. 30 – 300 Basen)
- Sequenzierleistung  $10^7$  bis  $10^{10}$  Basen pro Tag und System
- Kondensierung der Funktion zahlreicher parallel arbeitender Kapillarsequenzierer in ein Tischgerät

# Sequenziertiefe

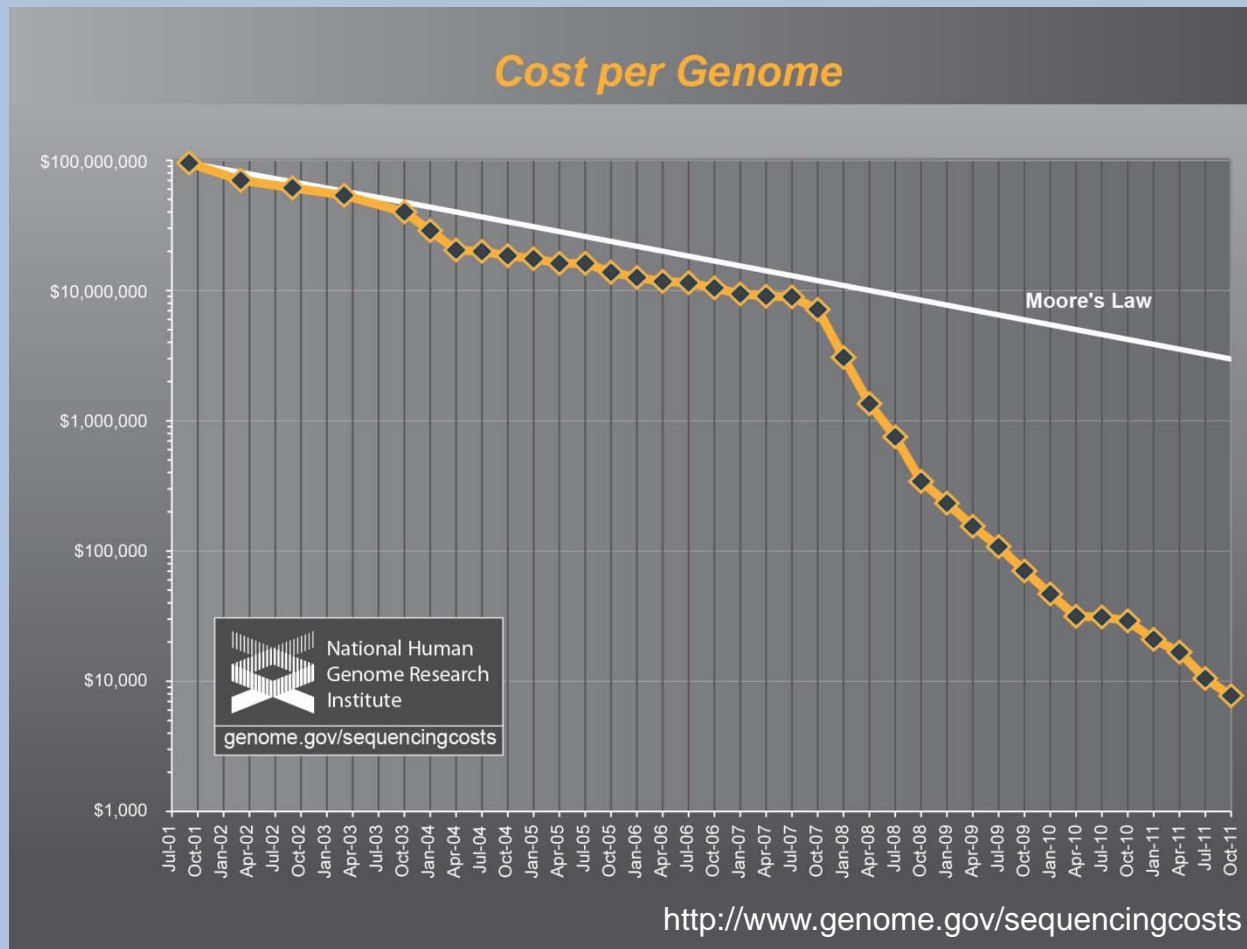
- Die Sequenziertiefe gibt an, wie oft ein bestimmter Abschnitt eines Genoms sequenziert wurde.
- Sie bestimmt damit maßgeblich die Zuverlässigkeit der Sequenzierung.
- Andererseits reduziert eine hohe Sequenziertiefe den Durchsatz bei der Sequenzierung.
- Konflikt:            Durchsatz ↔ Präzision



# Aktuelle Marktsituation

- Illumina HiSeq/Genome Analyzer  
ca. 60%
- Roche GS FLX/Junior  
ca. 20%
- Life Technologies SOLiD series  
ca. 20%

# Aktuelle Marktsituation



# Third Generation Sequenzierung

- Schrittweise Weiterentwicklung und Optimierung bekannter Methoden und Prinzipien
  - Ion-Torrent
  - Complete Genomics
- Einzelmolekül-Sequenzierung
  - Pacific Biosciences
  - Oxford Nanopores

# Third Generation Sequenzierung

- Ion Torrent/Life Technologies  
Weiterentwicklung der 454 Sequenzierung  
mit Signaldetektion durch Ion-Sensitive  
Field Effect Transistors (ISFET)
- Pacific Biosciences  
Einzelmolekül-Sequenzierung  
mittels Zero-mode Waveguides
- Oxford Nanopore  
Einzelmolekül-Sequenzierung  
an biologischen Nanoporen

# Fazit

- Die Technologie zur schnellen Sequenzierung ganzer Genome ist verfügbar.
- Sie wird kontinuierlich weiter entwickelt, sodass die zuverlässige Sequenzierung ganzer Genome für weniger als 1.000 € in wenigen Tagen nur eine Frage der Zeit ist.
- Eine Limitation stellt derzeit vor allem die Verarbeitung der Datenflut und damit die Interpretation der Ergebnisse dar.
- Bei den Verfahren der dritten Generation ist noch wenig über Zuverlässigkeit und Fehlerquote bekannt.

# Ausblick

- In der **Forschung** ist die Anwendung dieser Technologien von herausragender Bedeutung.
  - Molekulare Grundlage von Erkrankungen
  - Entwicklungsbiologie
  - Onkologie
  - Mikrobiologie
- In der **Patientenversorgung** wird die gezielte Diagnostik klassischer genetischer Erkrankungen deutlich erleichtert und beschleunigt.
- Die **ungezielte** Sequenzierung des Genoms bringt derzeit bei seriöser Betrachtung keine medizinisch relevante Information.

# Fakten zum Aufbau des Genoms

- ca. 30.000 Gene
- Die Funktion von mehr als der Hälfte der Gene ist heute noch unbekannt.
- < 2% der DNA kodiert für Proteine.
- ca. 95% der DNA liegt außerhalb von Genen – ihre Funktion ist noch weitgehend unbekannt.

# Offene Fragen

- Speicherung, Auswertung, Darstellung und Kommunikation der Ergebnisse
  - Welche bekannten Risiken müssen kommuniziert werden?
  - Wie kommunizieren wir bisher unbekannte Mutationen?
  - Welche Einschränkungen bezüglich der Bedeutung müssen bei bekannten Assoziationen gemacht werden (z.B. Effekte von Gen-Gen oder Gen-Umwelt Interaktionen)?
- Akzeptable Fehlerquote
  - Eine Fehlerquote von 0,001% bedeutet  $3 \times 10^4$  Fehler (d.h. möglicher Mutationen) bezogen auf das Gesamtgenom





UNIVERSITÄTS**medizin.**  
MAINZ

**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit**