



Hartmann, B<sup>1</sup>

# Next Generation Sequencing – neue Technologie, viele Möglichkeiten?

**Mit der Entdeckung und Einführung der Sanger Sequenzierung 1977 (1) begann ein Wettlauf der Sequenzierungstechnologie – wer schafft es zuerst das menschliche Genom zu sequenzieren? 1990 wurde das Humangenomprojekt mit dem Ziel das menschliche Genom vollständig zu sequenzieren und so Erbkrankheiten und die molekularen Mechanismen der Krebsentstehung besser zu verstehen, gegründet. Dieser internationale Forschungsverbund benötigte 13 Jahre und 3 Milliarden Dollar um unter anderem das menschliche Genom mittels Sanger Sequenzierung zu entschlüsseln (2). 2000 wurde gemeinsam von den US und den UK der erste Draft des menschlichen Genoms angekündigt (3-5). Mit der heutigen Next Generation Sequencing (NGS) Technologie dauert die technische Analyse eines Genoms weniger als eine Woche und die Materialkosten liegen unter CHF 1000.–.**

2005 kam die erste Next Generation Sequencing Plattform auf den Markt (454 GS FLX der Firma 454, heute Roche). Mit dieser Technologie wurde 2007 ein menschliches Genom in nur 2 Monaten sequenziert (6). Heutzutage gehört diese Technologie in jedem Genetik Labor zur Standardausstattung.

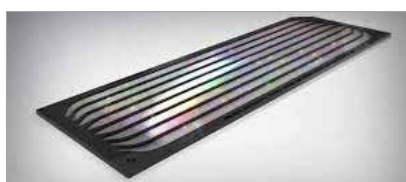


Abbildung 1.

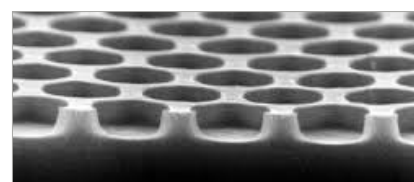


Abbildung 2.

## Methodenprinzip

Die Technologie Next Generation Sequencing (NGS, auch: Sequenzierung der nächsten Generation) wurde parallel von verschiedenen Firmen entwickelt. Allen gemeinsam ist das Grundprinzip der Sequenzierung von Millionen von DNA-Molekülen in einem einzigen Ansatz/Reagenzgefäss (z.B. die Flowcell von Illumina), weshalb die Methode auch oft als massives paralleles Sequenzieren bezeichnet wird. Die Plattform von Solexa/Illumina findet gerade in der genetischen Diagnostik häufig Anwendung. Die Illumina sequencing-by-synthesis (SBS)-Methode wurde 2006 von Solexa eingeführt. In einem ersten Schritt werden an beide Enden der zu sequenzierende DNA unterschiedliche Adapter-DNA-Sequenzen ligiert, um diese dann an eine planare, optische Oberfläche (sog. Flow Cell oder Trägerplatte) zu fixieren. Auf eine solchen Trägerplatte passen bis zu 8-10 Milliarden DNA-Moleküle (Angaben für die S4 Flowcell des NovaSeq6000). Über eine Brücken-PCR werden die DNA-Fragmente amplifiziert und durch Verwendung von fluoreszierenden Nukleotide erfolgt die Sequenzierung in Echtzeit. Die Nukleo-

otide funktionieren als reversible Terminatoren, es wird also immer nur eines auf einmal einbaut. Ein Laser regt die fluoreszierenden Nukleotide an und eine Kamera speichert ein Bild der leuchtenden Cluster. Dann wird der Farbstoff abgetrennt, und die Base ist wieder zugänglich für den nächsten Syntheszyklus. Die max. Leselänge hängt von der Qualität des Templates, der Effizienz der Polymerase und der Abtrennung des Farbstoffes ab. Mit der Zeit akkumulieren Fehler, die grössere Leselängen verunmöglichen. Eine weitere Eigenschaft der Illumina SBS-Methode ist das sogenannte paired-end Sequencing: Dabei werden beide Enden eines DNA-Fragments sequenziert, je nach Größe des DNA-Fragments überlappen die sogenannten Reads oder sind durch einen nicht-sequenzierten DNA-Teil (Insert) getrennt. Die paired-end-Sequenzierung ermöglicht nicht nur die Detektion von genomischen Rearrangements, repetitiven Sequenzelementen, Genfusionen und neuen Transkripten sondern produziert so auch die doppelte Anzahl der Reads und erlaubt ein genaueres Alignment. Anfang 2010 wurde eine neue Sequenzieretechnologie der Firma Life Technologies vermarktet welche das Halbleiterverfahren nutzt und auch als pH-vermittelnde Sequenzierung oder «Post-Light»-Sequenzierung bezeichnet wird. Die zu sequenzierende DNA

wird in Mikroreaktionskammern auf einem Halbleiterchip gebracht. Dabei kommt es durch den Einbau eines Nukleotids durch die DNA-Polymerase, ausgelöst von dem freigesetzten Wasserstoffion, zu einer Änderung des pH-Wertes. Diese Änderung wird auf dem ionensensitiven Chip, welcher Feldeffekttransistor-Sensoren besitzt, detektiert. Das gemessene pH-Signal ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Die Sequenzierung eines Halbleiterchips dauert 2-4 Stunden und es werden verschiedene Chip-Größen angeboten mit einem Durchsatz von bis zu 1 GB.

Unabhängig der verwendeten NGS Technologie müssen zur Analyse die Millionen der relativ kurzen erzeugten Sequenzen (zwischen 50-400bp), aneinandergereiht werden. Dies geschieht in der Humangenetik unter Zuhilfenahme des Referenzgenoms welches 2001 durch das Humane Genomprojekt bekannt ist. Anschliessend werden die Sequenzdaten ausgewertet, wofür es komplexe bioinformatische Algorithmen benötigt (oft kommerzielle Anbieter). Am Ende wird eine Liste von Varianten (Veränderungen im Vergleich zum Referenzgenom) generiert. Diese Varianten werden nun im Zusammenhang mit der Fragestellung ausgewertet und interpretiert. Im Durchschnitt trägt jede Person bis zu 300 loss-of-function Varianten in anno-

<sup>1</sup> Dr. sc. nat. Britta Hartmann, Abteilungsleiterin  
Medizinische Genetik Labormedizin, Institut für  
Labormedizin, Kantonsspital Aarau