

# Next Generation Sequencing in der medizinischen Forschung

PharmaForum 2014 Saarbrücken



# NEWS IN FOCUS

BIOPIA  
Protocol will stop  
exploitation — and create  
red tape p.14

BOTANY  
Forensic chemistry  
to stop South Africa's plant  
thieves p.17

ASTRONOMY  
Telescope data  
bounty sparks access  
debate p.18

ASTRONOMY  
Physicists debate  
future of Argentina's  
cosmic-ray observatory p.20



## Fast sequencing saves newborns

Rapid analysis of infant genomes is aiding diagnosis and treatment of inexplicably ill babies.

BY SARA REARDON

**B**y two months of age, the boy was near death. He had spent his entire short life in the neonatal intensive care unit (NICU) at Children's Mercy Hospital in Kansas City, Missouri, while physicians tried to work out the cause of his abnormalities. When his liver failed in April 2013, the medical staff warned his parents that the outlook was grim.

Then geneticist Stephen Kingsmore and his team at Children's Mercy took on the case. Within three days, they had sequenced the genomes of the baby and his parents, and identified a rare mutation that was common to the child and both of his parents. The mutation turned out to be linked to a disease in which an overactive immune system damages the liver and spleen. Armed with a diagnosis, the baby's physicians put him on drugs to lower his immune response. The boy is now at home

Misha Angrist, a genomic-policy expert ▶

2 OCTOBER 2014 | VOL 514 | NATURE | 13

## Genomsequenzierung und Trio-Analyse rettet Leben eines neugeborenen Jungen

- **Sequenzierung der kompletten Genome von Vater, Mutter und Kind und Trio-Analyse innerhalb von 3 Tagen: Identifizierung einer seltenen Mutation die mit einer Autoimmunerkrankung gekoppelt ist**
- **Rettung des Neugeborenen nach 3 Tagen durch Immunsuppression**
- **Eine klassische Diagnose mit konventionellem DNA Test hätte mehr als einen Monat benötigt – der Junge wäre gestorben**



GA  
GAGA  
GAGAGA

# Aktuelle Sequenzierungstechnologien



©2014 Illumina, Inc. All rights reserved.

**Illumina:**  
MiSeq (50 Mio Reads, 300 bp)  
NextSeq (800 Mio Reads, 150 bp)  
HiSeq 2500 (8 Mrd Reads, 150 bp)  
HiSeq X Ten (10x 6 Mrd Reads, 150 bp)



**Life Technologies:**  
Ion PGM System (5,5 Mio Reads, 400 bp)  
Ion Proton (80 Mio Reads, 200 bp)



**Roche 454:**  
GS Junior+ (100 k Reads, 700 bp)  
GS FLX+ (1 Mio, 1000 bp)

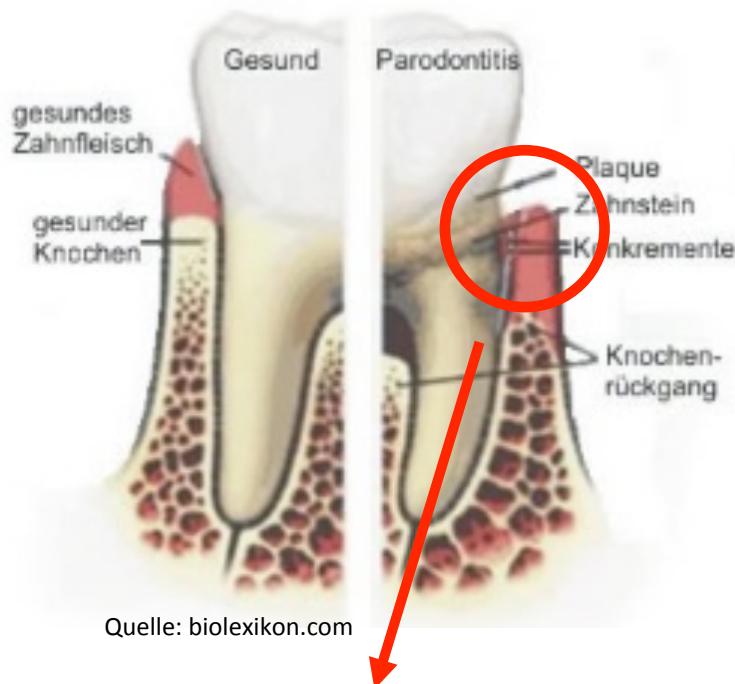


**Pacific Biosciences:**  
PACBIO RS II (50 k Reads, 10-40 kb)

# NGS-Anwendungen in der medizinischen Forschung:

<u>Untersuchungs-Ziel:</u>	<u>Workflow:</u>	<u>Beispiel:</u>
Einzelne Gene	Amplicon-Seq	Somatische Mutationen in Tumoren
Exons	Exome-Seq	Identifizierung von Tumor-Subpopulationen
Genom	WG-Seq	Humangenetische Trio-Analyse
Transkriptom (RNA)	RNA-Seq	Genexpression in der Tumorgenese
Epigenetische Merkmale	ChIP-Seq, miRNA-Seq u.a.	Identifizierung adaptiver Mechanismen in überlebenden Tumorzellen
....	....	
Meta-Genomik (Bakterien)	16S-Seq	Mikrobiom z.B. bei Parodontose

# Metagenomanalyse bei einem Parodontitis-Patienten



Parodontitis ist eine entzündliche bakterielle Erkrankung des Zahnbetts. Folgen:

- Zahnausfall und Rückbildung des Kieferknochens
- Erhöhtes Risiko für Herzinfarkt, Schlaganfall, Thrombosen
- Lungenentzündungen
- Infektionen an (künstlichen) Gelenken
- Unfruchtbarkeit und Fehlgeburten
- Zuckerkrankheit\*

\*Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V.

Tag 1: Direkte Amplifikation der 16 SrRNA-V4 Region in einer 1-Schrittreaktion zur fertigen Illumina-Bibliothek

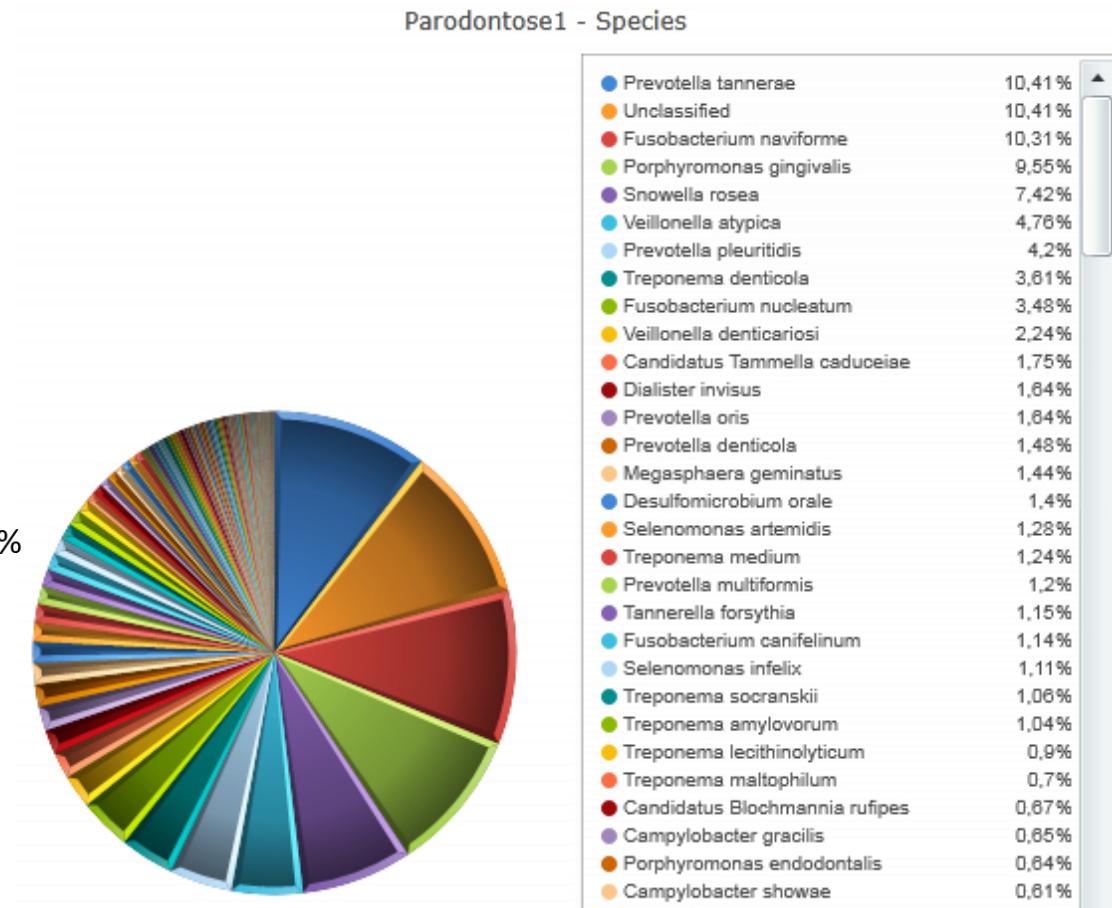
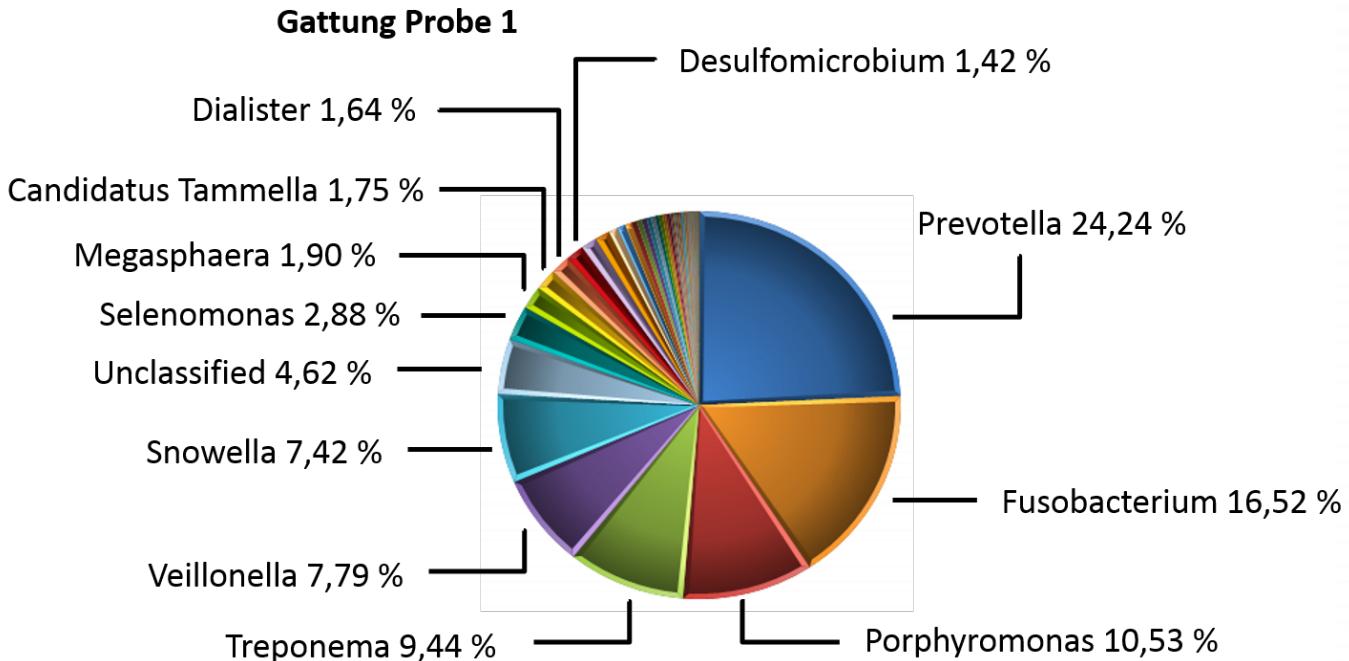


Tag 2-3: Sequenzierung mit 2x300 bp auf Illumina MiSeq



Tag 4:  
Datenanalyse

# Metagenomanalyse bei einem Parodontitis-Patienten



# Metagenomanalyse bei einem Parodontitis-Patienten: Ergebnis

## Identifizierte Markerkeime:

	Antibiotikum	Parodontose 1	Parodontose 2	Patogenität
<b>Porphyromonas</b>	SRP plus Metronidazol evtl. Clindamycin, Antibiotikaresistenz gegen Amoxicillin	10,53 %	18,32 %	sehr stark pathogen
<b>Tannerella</b>	SRP plus Metronidazol evtl. Clindamycin, Zudem Antibiotikaresistenz gegen Amoxicillin	1,18 %	1,78 %	sehr stark pathogen
<b>Treponema</b>	SRP plus Metronidazol evtl. Clindamycin Antibiotikaresistenz gegen Amoxicillin	9,44 %	17,78 %	stark pathogen
<b>Prevotella</b>	SRP plus Metronidazol evtl. Clindamycin, Antibiotikaresistenz gegen Amoxicillin	24,24 %	10,18 %	stark pathogen
<b>Fusobacterium</b>	SRP	16,52 %	17,30 %	moderat pathogen
<b>Campylobacter</b>	SRP	1,28 %	1,65 %	moderat pathogen
<b>Eikenella</b>	SRP + Amoxicillin Antibiotikaresistenz gegen Metronidazol und Clindamycin	0,11 %	0,23 %	moderat pathogen

## Weitere identifizierte parodontitis-assoziierte Keime:

	Parodontose 1	Parodontose 2	Patogenität
<b>Veillonella</b>	7,79 %	0,19 %	stark pathogen
<b>Selenomonas</b>	2,88 %	0,31 %	stark pathogen
<b>Desulfomicrobium</b>	1,42 %	2,29 %	moderat pathogen
<b>Desulfovibrio</b>	0,40 %	0,97 %	unbekannt
<b>Megasphaera</b>	1,9 %	0,63 %	unbekannt
<b>Mogibacterium</b>	0,29 %	0,66 %	unbekannt
<b>Pectinatus</b>	0,52 %	0,7 %	unbekannt
<b>Dialister</b>	1,64 %	0,22 %	moderat pathogen
<b>Actinomyces</b>	0,32 %	0,24 %	unbekannt

