

Aktuelle Trends bei NGS

Bernreiter Andreas

29.11.2017



Next-Generation-Sequencing (NGS)

„**Massive parallel sequencing**“ : 100.000 DNA Moleküle können gleichzeitig sequenziert werden. Humangenom kann in einer Woche sequenziert und ausgewertet werden.

Sanger-Sequenzierung (First Generation Sequencing) : Einzelne DNA Moleküle werden sequenziert. Es hat 13 Jahre gedauert um erstes Genom zu sequenzieren (1990 – 2003). [3 Millionen \$]



Maisblätter Krankheitssymptomen

RNA-seq

Illumina Hi-seq 2000, 2016



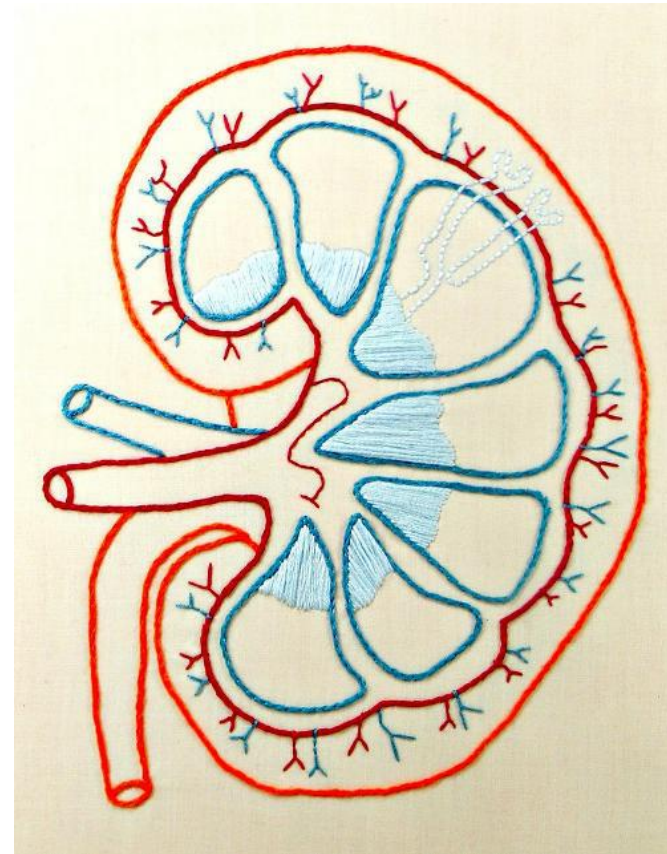
Bernreiter A, Garcia Teijeiro R, Jarrin D, Garrido P, Ramos L, 2017. First report of **Maize yellow mosaic virus** infecting maize in Ecuador. *New Disease Reports* 36, 11



Virale Enzephalitis bei Nierentransplantation

RNA-seq

Illumina HiSeq 2500, 2016



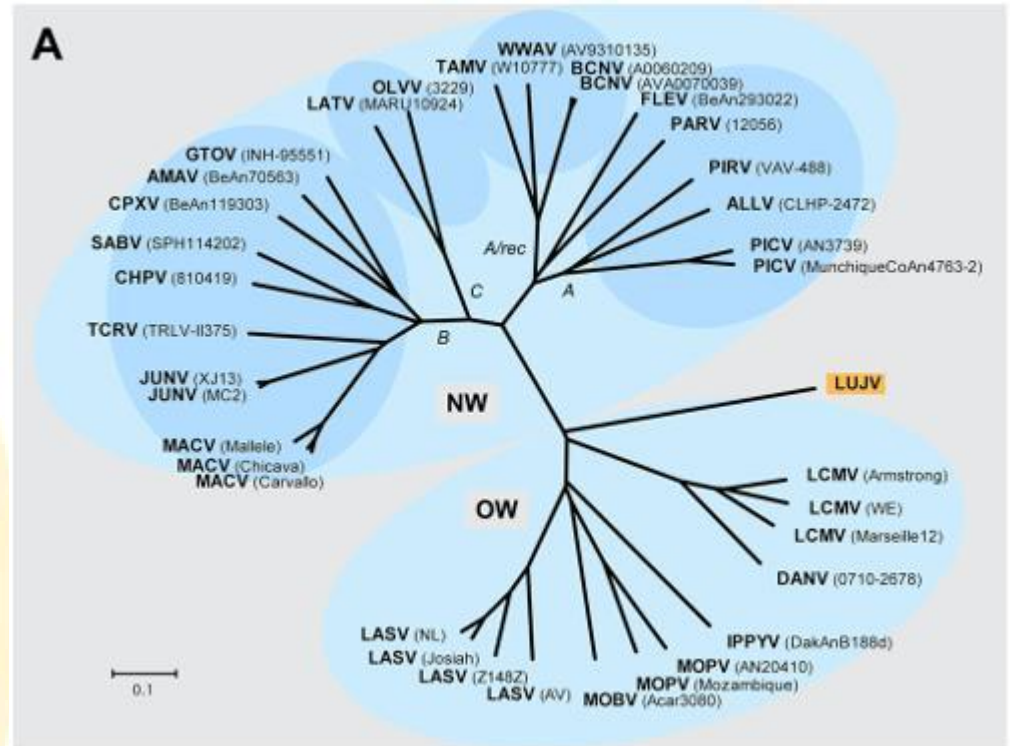
Wilson MR, Zimmermann LL, Crawford ED, Sample HA, Soni PR, Baker AN, Khan LM & DeRisi JL.
Acute West Nile Virus Meningoencephalitis Diagnosed Via Metagenomic Deep Sequencing of
Cerebrospinal Fluid in a Renal Transplant Patient. *Am J Transplant* 2017; 17: 803–808



hämorrhagisches Fieber

RNA-seq

Roche 454, 2008

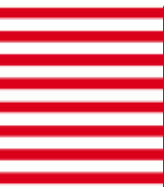


Briese et al. Genetic Detection and Characterization of **Lujo Virus**, a New Hemorrhagic Fever–Associated **Arenavirus** from Southern Africa. *PLoS Pathogens*, 2009; 4 (5):

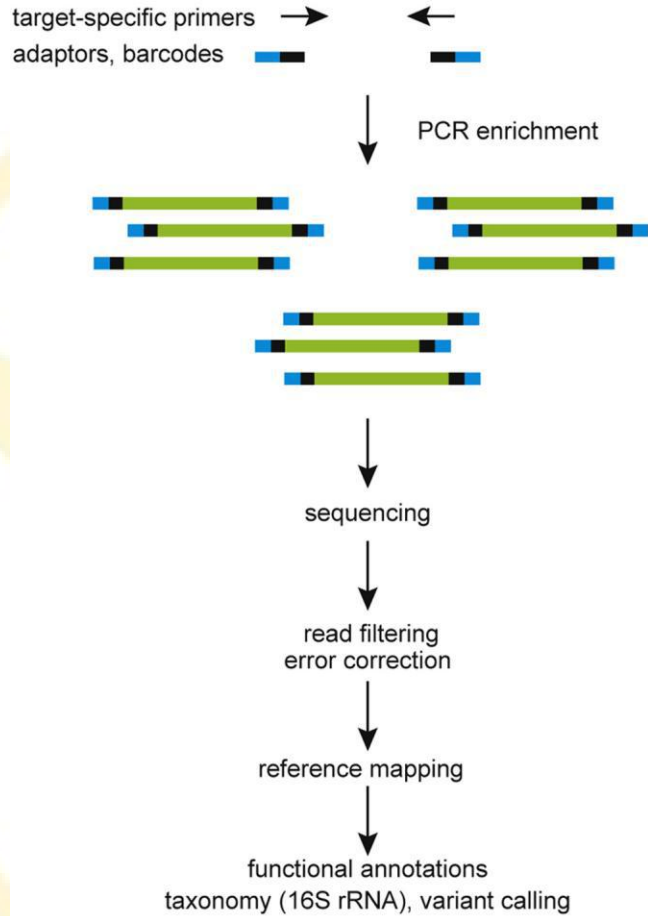


Wichtige NGS Plattformen

Hersteller	Produkte	Länge der Reads	Throughput	Notes
Illumina	MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq	<350bp	<1500 Gb	Marktführer
Thermo Fisher	IonPGM, IonProton, IonS5 System,	<500bp	<10 Gb	schnell 2- 7h
Pacific Biosciences	Sequel, PacBio RS II	<20kb	<1 Gb	Fehlerhaft !
Oxford Nanopore	MinIon, Promethion	<240kb	<5 Gb	Fehlerhaft !
Roche	454	<700bp	<600 Mb	Erste kommerzielle Plattform 2005
Qiagen	GeneReader	~ 100bp	?	Für klinische Resequenzierung !
SOLiD	5500xl	50bp	~320Gb	6 - 10 Tage Laufzeit !



Targeted amplicon sequencing



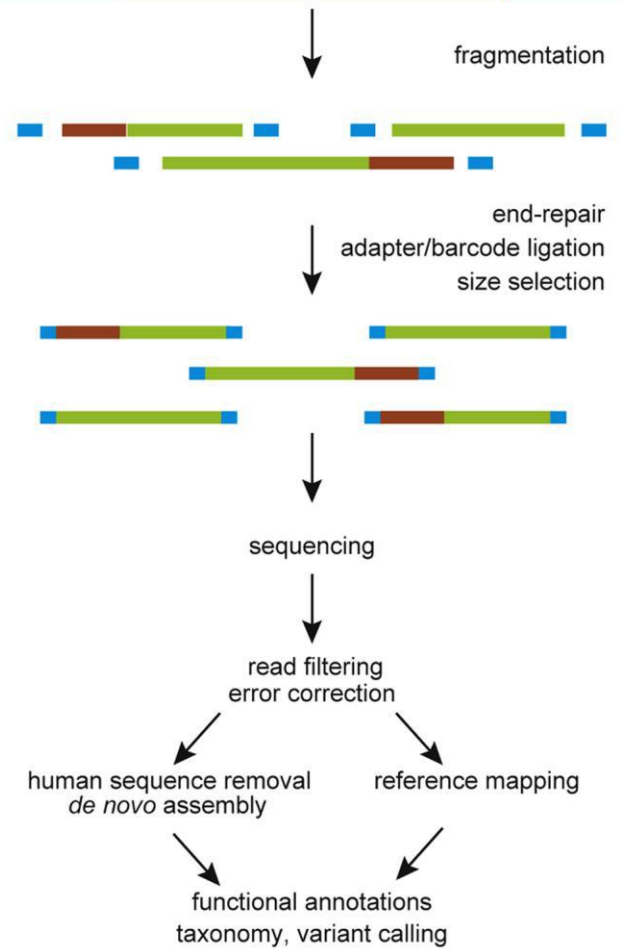
Template DNA

Library preparation

Sequencing

Data analysis

Whole-genome sequencing



Lefterova et al., 2015. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2015 17, 623-634 DOI: (10.1016/j.jmoldx.2015.07.004)



Bio Products

Klinische Anwendungen von NGS

Onkologie

Somatisches **Tumor-Panel** zur Therapieentscheidung

Grundlage für „Personalisierte Medizin“ : maßgeschneiderte Therapie für den Patienten wird festgestellt

Das Somatische Tumor-Panel kann mehr als **700 Gene** in denen Mutationen bekannt sind beinhalten ! Für die Untersuchung wird sowohl Tumorgewebe als auch Normalgewebe des Patienten benötigt. Die Identifikation somatischer Mutationen ermöglicht eine genauere Diagnostik von Tumorerkrankungen und kann so die Auswahl einer geeigneten Therapie unterstützen.



Klinische Anwendungen von NGS

Nicht-Invasiver Pränataltest (NIPT)

Mittels NGS (quantifizierung der Sequenzen) kann Trisomie 21(Down-Syndrom), 18 (Edwards-Syndrom) oder 13 (Patau-Syndrom) festgestellt werden.

Untersucht wird zellfreie, fetale DNA (cffDNA) im mütterlichen Blut

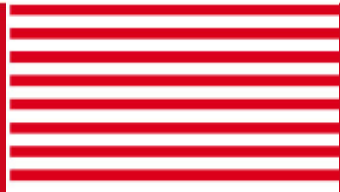
Durch diese nicht-invasive Untersuchung können invasive Techniken, wie Chorionzottenbiopsie oder Amnionzentese vermieden werden



Pharmakogenomik Gene Panel

Die Pharmakogenomik untersucht den Einfluss der genetischen Variation auf die Arzneimittelwahl des Patienten

Panels mit **> 50 Genen** : Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) werden untersucht. Nach der Wirksamkeit und / oder Toxizität des Arzneimittels wird entsprechend dem Genotyp des Patienten optimiert: maximale Wirksamkeit mit minimalen Nebenwirkungen.



Klinische Anwendungen von NGS

NGS in der Hämatologie

Genepanel :

AML - akuter myeloischer Leukämie > 30 Gene

MDS - myelodysplastischen Syndromen > 30 Gene

CMML - chronischen myelomonozytären Leukämien > 9 Gene



Klinische Anwendungen von NGS

NGS in der Virologie

HIV, das Hepatitis B-Virus (HBV) und das Hepatitis C-Virus (HCV), deren fehleranfällige Replikationsmaschinerie in Kombination mit der hohen Replikationsrate bei jedem infizierten Individuum zur Bildung vieler genetisch verwandter Individuen führt -> **Virusvarianten**, die als Quasi-Spezies bezeichnet werden.

HIV-Resistenztestung

Die wichtigsten NGS-Anwendungen für HIV-Variabilität umfassen den Nachweis von Resistenzen gegen antiretrovirale Medikamente

HBV Resistenzbestimmung

Dies ermöglicht den Nachweis eventuell vorliegender Resistenzen gegenüber antiviralen Medikamenten wie Lamivudin (3TC), Adefovir (ADF), Entecavir (ETV), Telbivudin (LdT) und Tenofovir (TDF).ht

Parker J, Chen J. Application of next generation sequencing for the detection of human viral pathogens in clinical specimens. J Clin Virol 2017; 86: 20–26.



NGS workflow



DNA
Extraction



Library
Construction



Sequencing



Data Analysis



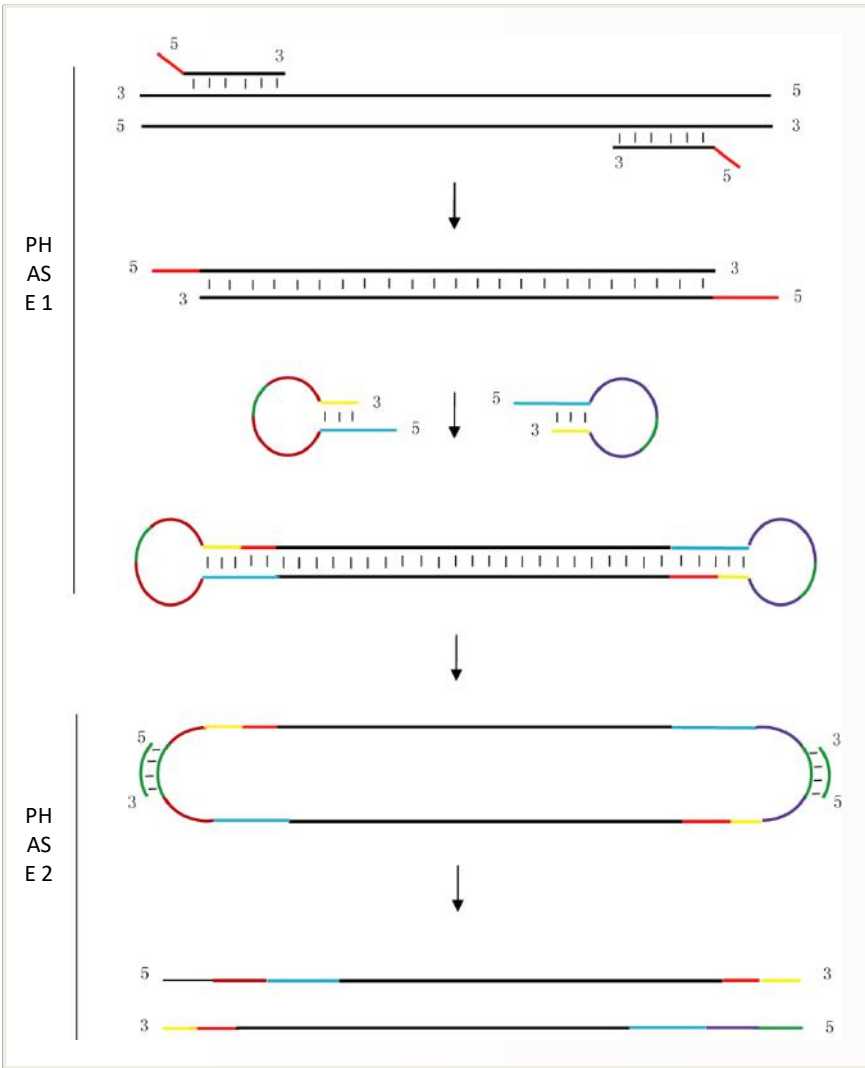
SpaceGen[®] wurde 2015 gegründet und befindet sich in Xiamen, Provinz Fujian. SpaceGen[®] befasst sich mit Forschung und Entwicklung, Produktion und Dienstleistungen in der Onkologie-Präzisionsmedizin.



Comparison of Library Construction Technology

Method	RingCap [®]	Ampliseq [®]	Probe Capture Technology
Manufacturer	Spacegen	Thermo Fisher(Life technology)	Illumina, Agilent, NEB, IDT
Principle	Ring-Link capture amplification technology	Multiple PCR amplification technology	Probe capture technology
Feature	The accomplishment of the amplification of the target sequence and the linkage of the specific sequence with single tube.	The accomplishment of the amplification of the target sequence and the linkage of the specific sequence with multi-steps.	The accomplishment of the capture and the amplification of the target sequence with probe.
Step	2 steps	8 steps	17 steps
Time	4.5 hours	8 hours	>36 hours
Manual operation time	45~ mins	4 hours	12 hours
Required Sample Size	1~10ng DNA or RNA	1~10ng DNA or RNA	50~100ng DNA
Price/Performance ratio	High	Medium	Low

Technical flowchart of RingCap[®] technology



Phase 1

1. With the modified specified primers and specified Spacegen-Taq Enzyme to amplify the target region, while the product fragments all end up with the sticky end.
2. With the aid of DNA ligase, the asymmetric probes will be ligated to the sticky ends, forming special ring products and avoiding the self-ligation among the products.

Phase 2

Amplify the above products with the specified primers, obtaining the targeted sequences and adding the necessary mark sequence to the final products.

NGS Produkte CE - zertifiziert

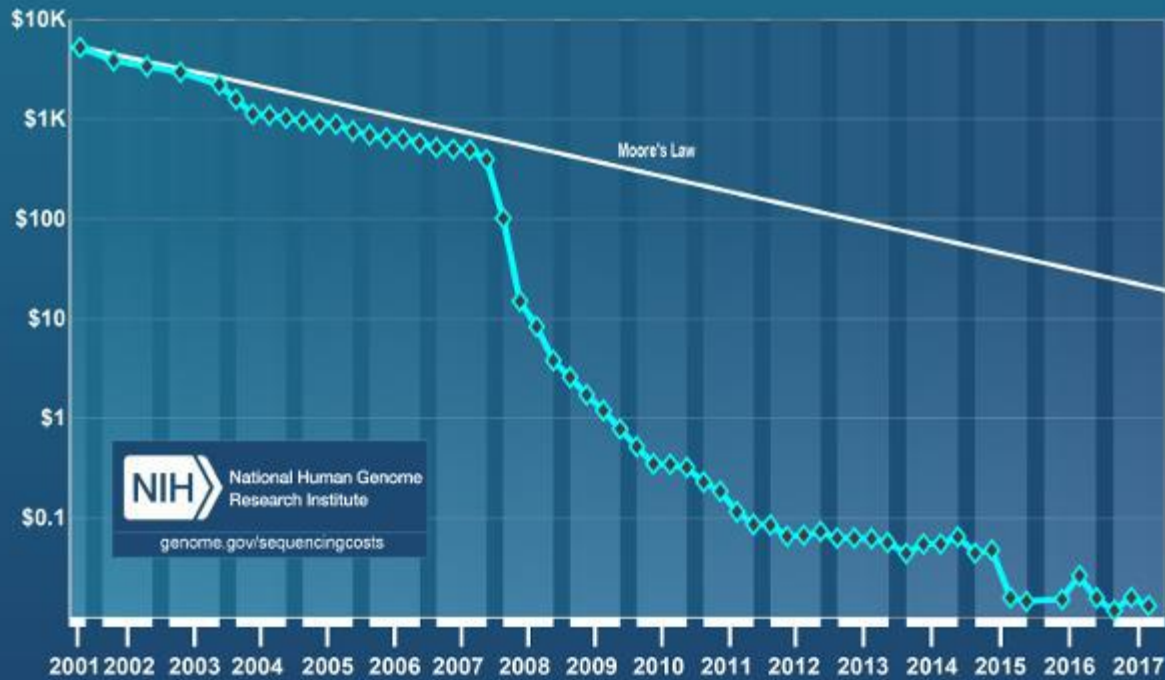
NUMBER	PRODUCT	CFDA	CE-IVD	ISO13485
1	Next generation sequencing library Kit(next-generation sequencing)	√	---	
2	Human oncology multi-gene mutation kit (next-generation sequencing)	Finish registration in NIFID, Innovative Medical Device Application	√	√
3	Human BRCA1 and BRCA2 gene mutation kit (next-generation sequencing)	Certification Start	√	√
4	Human drug relation SNP detection kit (next-generation sequencing)	---	---	
5	Human lung infection pathogen identification Kit(next-generation sequencing)	---	---	
6	Human GIST multi-gene mutation kit (next-generation sequencing)	---	---	
7	Human breast cancer monitoring detection kit(next-generation sequencing)	---	---	

Human oncology multi-gene mutation kit (SpaceGen)

No.	Name	Mutation Type	Gene Type	Covered Exons	Number of Hotspot Mutations
1	EGFR	Gene mutation	DNA	18,19,20,21	100
2	KRAS			2,3,4	57
3	BRAF			15	50
4	PIK3CA			9,20	54
5	NRAS			2,3,4	25
6	HER2			19,20,21	12
7	MET			2,14,16,19,20	13
8	AKT1			3	1
9	c-KIT			9,11,13	23
10	PDGFRA			18	4
11	ALK	Fusion mutation	RNA	EML4-ALK	26
12	RET			KIF5B-RET、CCD6-RET	9
13	ROS1			CD74-ROS1, EZR-ROS1, GOPC-ROS1, SLC34A2-ROS1	15



Cost per Raw Megabase of DNA Sequence



Danke !

