

RCU - Next Generation Sequencing

■ **Verantwortlich:** Dr. Oliver Dittrich-Breiholz

■ **Ansprechpartner:** Dr. Lutz Wiehlmann

Tel.: 0511/532-5334 • E-Mail: rcu.ngs@mh-hannover.de

■ Keywords: Next Generation Sequencing, NGS, Exom, Transkriptom, ChIP, Epigenetics, Biobank, Mikrobiom, Amplicon, Metagenom, Metagenomics, whole genome, Hochdurchsatzsequenzierung, Illumina, SOLiD

Forschungsprofil

RCU Next Generation Sequencing

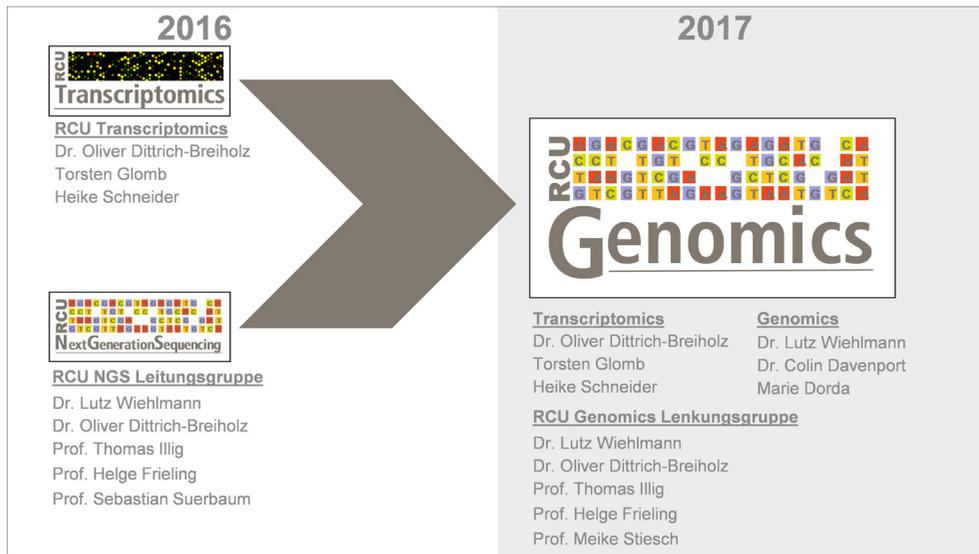
Gründung und Aufbau

Die 2015 neu gegründete Research Core Unit Next Generation Sequencing (RCU-NGS) verfolgt das Ziel, allen an der MHH forschenden Kliniken und Instituten Zugang zur NGS-Technologie zu ermöglichen. Das erarbeitete Konzept basiert auf einer arbeits- und verantwortungsteiligen Leitungsgruppe, um so die Expertise in Next Generation Sequencing an der MHH bündeln und hochschulweit Arbeitsgruppen ein uneingeschränktes Spektrum an NGS- Techniken anbieten zu können. Die Core Unit ist als „echte Research Core Unit“, angelehnt an die bereits bestehenden, gut etablierten MHH Core Units, gemäß der Richtlinien der European Science Foundation zum Betrieb von Core Units und Großgerätezentren aufgebaut. Dies schließt ein, dass sich die strategische Ausrichtung (in Fragen zur Erweiterung) immer grundsätzlich am jeweiligen Bedarfsaufkommen für NGS-Analysen innerhalb der MHH orientiert.

Die Mitglieder der Leitungsgruppe vertreten jeweils einen Teilbereich des NGS- Spektrums (Dr. Lutz Wiehlmann (Genomics), Prof. Dr. Helge Frieling (Epigenomics), Dr. Oliver Dittrich-Breiholz (Transcriptomics), Prof. Dr. Sebastian Suerbaum (Pathogenomics), Prof. Dr. Thomas Illig (Clinical Specimens), Sprecher der RCU-NGS: ist Dr. Oliver Dittrich-Breiholz).

Die Leitungsgruppe hat sich insgesamt folgende Ziele gesetzt:

- 1) Bündelung und effiziente Ausnutzung der bislang an der MHH vorhandenen Expertise und dezentralen NGS-Geräteinfrastruktur.
- 2) Betreuung von NGS-Projektanfragen und Etablierung neuer NGS-Protokolle (Versuchsplanung, experimentelle Umsetzung, Kostenabwicklung, Datenauswertung, Antragsstellung).
- 3) Anschaffung und Betrieb eines leistungsstarken Sequencers der Firma Illumina.
- 4) Schrittweiser weiterer Ausbau der Einrichtung und Zusammenschluß mit der RCU Transcriptomics zu einer leistungsstarken, national und international konkurrenzfähigen Core Unit „Genomics“ im Jahr 2017.



NGS- Projekte

Im Jahr 2016 wurden folgende NGS-Projekte durchgeführt:

Teilbereich Genomics: 3 humane Genome, 11 Rattengenome, 24 Exome, 4 CLP-Seq, 192 Metagenome, ca. 900 Amplicon-Sequenzierungen (mit durchschnittlich 10 PCR-Produkten/Seq.).

Teilbereich Transcriptomics: 154 RNA-Seq Analysen, davon 94 unter Einsatz geringer RNA Mengen (1-10 ng total RNA).

Mit der AG Prof. Burkhard Tümmler (Pädiatrische Pneumologie, Deutsches Zentrum für Lungenforschung DZL/BREATH) wurde ein im letzten Jahr entwickeltes Verfahren zur Metagenomanalyse weiter optimiert und für die Nutzung von Illumina- Sequencern erweitert. Ziel war hierbei, direkt aus einer Probe vom Patienten direkt DNA zu gewinnen und zur Sequenzierung einsetzen zu können. Es konnte ein Protokoll erarbeitet werden, bei dem die Aufreinigung der DNA in weniger als 1 h erfolgen kann. Selbst bei weniger als 5 ng Input-DNA können daran anschließend innerhalb von 10 h qualitätsgeprüfte Fragmentbibliotheken zur Sequenzierung auf NGS- Plattformen (Illumina, SOLiD) erzeugt werden. Zur Auswertung wurde eine bioinformatische Pipeline entwickelt, mit der sich automatisiert Metagenome qualitativ und quantitativ auswerten lassen. Zusätzlich wurden Routinen entwickelt, um neben Bakterien auch Pilze und Viren zu erfassen.

Mehrere Arbeitsgruppen der MHH haben unter Federführung der AGs Prof. Meike Stiesch (Zahnärztl. Prothetik) und Prof. Sebastian Suerbaum (Med. Mikrobiologie) einen Pacific Bioscience Sequel erworben und so das Spektrum der an der MHH vorhandenen NGS- Technologien entscheidend erweitert. Die Core Unit Next Generation Sequencing war von Anfang an in der Protokollentwicklung und der Etablierung des Systems eingebunden und entwickelt zusammen mit mehreren AGs Methoden und Auswertepipelines.

Zusammen mit Mitarbeitern der AG Prof. Ulrich Martin (Rebirth) wurde ein Verfahren zur Detektion seltener klonaler Varianten in einer Zellpopulation weiterentwickelt. Neben der bisherigen Nutzung eines SOLiD- Sequenzierers zur Generierung von Einzelreads hoher Genauigkeit wurde ein bioinformatisches Filterverfahren entwickelt, mit dem die Detektion von weniger als 1 abweichenden in 5000 Zellen möglich ist. Die so erreichte Sensitivität ist anderen, international verfügbaren Verfahren um mehr als den Faktor 30 überlegen.

Bioinformatische Schulungen

Im Zuge der Projektbetreuung zeigte sich, dass hochschulweit ein großer Unterstützungsbedarf bei bioinformatischen Auswertungen von NGS-Daten besteht. Mitarbeiter/innen der MHH können Ihren Bedarf zur Kursteilnahme über folgenden link anmelden: <https://www.mh-hannover.de/32147.html>.

Forschungspreise

Mukoviszidose-Preis der Mylan Healthcare GmbH für die Arbeit „Das mikrobielle Metagenom der Mukoviszidose“.

Ausgewählte Publikationen unter Beteiligung von RCU-NGS

1: Fischer S, Greipel L, Klockgether J, Dorda M, Wiehlmann L, Cramer N, Tümmler B. Multilocus amplicon sequencing of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis airways isolates collected prior to and after early antipseudomonal chemotherapy. *J Cyst Fibros*. 2016 Nov 8. pii: S1569-1993(16)30648-8.

2: Chouvarine P, Wiehlmann L, Moran Losada P, DeLuca DS, Tümmler B. Filtration and Normalization of Sequencing Read Data in Whole-Metagenome Shotgun Samples. *PLoS One*. 2016 Oct 19;11(10):e0165015.

3: Moran Losada P, Chouvarine P, Dorda M, Hedtfeld S, Mielke S, Schulz A, Wiehlmann L, Tümmler B. The cystic fibrosis lower airways microbial metagenome. *ERJ Open Res*. 2016 May 9;2(2). pii: 00096-2015.

4: Greipel L, Fischer S, Klockgether J, Dorda M, Mielke S, Wiehlmann L, Cramer N, Tümmler B. Molecular Epidemiology of Mutations in Antimicrobial Resistance Loci of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Oct 21;60(11):6726-6734.

5: Fischer S, Klockgether J, Morán Losada P, Chouvarine P, Cramer N, Davenport CF, Dethlefsen S, Dorda M, Goesmann A, Hilker R, Mielke S, Schönfelder T, Suerbaum S, Türk O, Woltemate S, Wiehlmann L, Tümmler B. Intracolonial genome diversity of the major *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14. *Environ Microbiol Rep*. 2016 Apr;8(2):227-34.