

26. BÖLÜM

YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİLERİNİN GELECEĞİ: NANOPORE SEKANSLAMA

Alper GEZDİRİCİ¹

GİRİŞ

Nanopore sekanslama, dördüncü nesil dizi analizi yöntemleri içerisinde yer alan yeni bir teknolojidir. Nanopore; lipid katman üzerine gömülü, iyon değişimini kolaylaştırmaya yarayan ve protein kanalında bulunan biyolojik porudur (1). Nanopore dizileme teknolojisi ssDNA molekülünü real-time sekanslama yapan; ultra hızlı ve düşük maliyetli bir teknolojidir (2). DNA dizisi, DNA molekülünün nano ebatındaki porlardan geçişi anında nükleotidlerin meydana getirdiği elektrofizyolojik değişiklikler analiz edilerek bulunur (3). Bir DNA ya da RNA molekülü, Nanopore sekanslama teknolojisi kullanılarak PCR amplifikasyonu ya da kimyasal etiketlenmesine gerek duyulmadan dizilenmektedir (4). Nanopore sekanslamanın elektriksel dirençli bir membranında stabilize edilmiş bir protein nanoporeundan, tek iplikli DNA'nın uzun bir kısmı geçerken, aktif DNA sentezi olmadan nükleotitleri doğrudan tespit etmesi ile kendisini önceki yaklaşımlardan ayırır (5).

Nanopore sekanslama, 1980'lerden bu yana birçok laboratuvarlardan kökenlenerek doğmuştur (6). Nanopore sekanslama fikri Deamer ve Branton tarafından ve ayrı olarak Church tarafından önerildi (7). Bu kavram; elektroforez ile bir membranın nanoskobik porundan geçen tek bir DNA iplikçığının sekansının mümkün olabileceği fikriydi. Aynı zamanda George Church'un insan genom projesinde çalışırken, DNA'nın kendini nasıl işlediği ve sistematik olarak onu ortaya çıkarma ilgisi Church 'u; çift katmanda gömülü, elektronik olarak izlenen bir faj motorunun çift iplikli DNA'yı işlemesi ile dizilenebileceği

¹ Uzm. Dr., Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Tıbbi Genetik, dralpergezdirici@gmail.com

SONUÇ

Nanopore sekanslamanın piyasaya sürülmesinin ardından insan genomlarının elde taşınabilecek cihazlar ile sekanslanabilecek olmaları birden fazla araştırmacı tarafından elde edildi. DNA dizilimlerinin yanısıra RNA modifikasyonlarını saptama çalışmaları ve doğrudan dizilenmesi bu teknoloji için oldukça umut vericidir. İnsan hastalıklarının moleküler tanısına yardımcı olmak, insan genomunun bütünüyle ve eksiksiz dizileme çalışmaları nanopore sekanslama teknolojisi için sadece bir zaman meselesidir (22,35). Kişiselleştirilmiş tıp, hedefe yönelik tedaviler ve gen tedavisi çalışmalarının hızla ilerleyeceği gelecekte, insanın tüm genom dizilemesi artık USB bellek kadar bir cihaz içinde sürekli yanında bulunduracağı bir aksesuar olacaktır.

KAYNAKÇA

1. Song L, Hobaugh MR, Shustak C, et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*. 1996 Dec 13;274(5294):1859-66.
2. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016 Oct;14(5):265-279.
3. Fyta M. Threading DNA through nanopores for biosensing applications. *J Phys Condens Matter*. 2015 Jul 15;27(27):273101.
4. Feng Y, Zhang Y, Ying C, et al. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015 Feb;13(1):4-16.
5. Branton D, Deamer DW, Marziali A, et al. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008 Oct;26(10):1146-53.
6. Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*. 2016 May 6;34(5):518-24.
7. Pennisi E. Genome sequencing. Search for pore-fection. *Science*. 2012 May 4;336(6081):534-7.
8. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, et al. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):13770-3.
9. Gouaux JE, Braha O, Hobaugh MR, et al. Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20;91(26):12828-31.
10. Faller M, Niederweis M, Schulz GE. The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science*. 2004 Feb 20;303(5661):1189-92.
11. Manrao EA, Derrington IM, Pavlenok M, et al. Nucleotide discrimination with DNA immobilized in the MspA nanopore. *PLoS One*. 2011;6(10):e25723.
12. Derrington IM, Butler TZ, Collins MD, et al. Nanopore DNA sequencing with MspA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 14;107(37):16060-5.
13. Li J, Stein D, McMullan C, et al. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature*. 2001 Jul 12;412(6843):166-9.
14. Dekker C. Solid-state nanopores. *Nat Nanotechnol*. 2007 Apr;2(4):209-15.
15. Wang Y, Yang Q, Wang Z. The evolution of nanopore sequencing. *Front Genet*. 2014;5:449.
16. Jain M, Koren S, Miga KH, et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat Biotechnol*. 2018 Apr;36(4):338-345.
17. Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D, et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods*. 2018 Mar;15(3):201-206.

18. Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, et al. Nanopore DNA Sequencing and Genome Assembly on the International Space Station. *Sci Rep*. 2017 Dec 21;7(1):18022.
19. Ameer A, Kloosterman WP, Hestand MS. Single-Molecule Sequencing: Towards Clinical Applications. *Trends Biotechnol*. 2019 Jan;37(1):72-85.
20. Green MR, Sambrook J, Sambrook J. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.
21. Leggett RM, Heavens D, Caccamo M, et al. NanoOK: multi-reference alignment analysis of nanopore sequencing data, quality and error profiles. *Bioinformatics*. 2016 Jan 1;32(1):142-4.
22. Norris AL, Workman RE, Fan Y, et al. Nanopore sequencing detects structural variants in cancer. *Cancer Biol Ther*. 2016;17(3):246-53.
23. Belser C, Istace B, Denis E, et al. Chromosome-scale assemblies of plant genomes using nanopore long reads and optical maps. *Nat Plants*. 2018 Nov;4(11):879-887.
24. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc*. 2017 Jun;12(6):1261-1276.
25. Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, et al. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Jan;72(1):104-114.
26. Gigante S. Picopore: A tool for reducing the storage size of Oxford Nanopore Technologies datasets without loss of functionality. *F1000Res*. 2017;6:227.
27. Rand AC, Jain M, Eizenga JM, et al. Mapping DNA methylation with high-throughput nanopore sequencing. *Nat Methods*. 2017 Apr;14(4):411-413.
28. Schreiber J, Wescoe ZL, Abu-Shumays R, et al. Error rates for nanopore discrimination among cytosine, methylcytosine, and hydroxymethylcytosine along individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 19;110(47):18910-5.
29. Euskirchen P, Bielle F, Labreche K, et al. Same-day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real-time nanopore sequencing. *Acta Neuropathol*. 2017 Nov;134(5):691-703.
30. Rang FJ, Kloosterman WP, de Ridder J. From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biol*. 2018 Jul 13;19(1):90.
31. Kono N, Nakamura H, Ohtoshi R, et al. The bagworm genome reveals a unique fibroin gene that provides high tensile strength. *Commun Biol*. 2019;2:148.
32. Kono N, Nakamura H, Ohtoshi R, et al. Orb-weaving spider *Araneus ventricosus* genome elucidates the spidroin gene catalogue. *Sci Rep*. 2019 Jun 10;9(1):8380.
33. Patel A, Belykh E, Miller EJ, et al. MinION rapid sequencing: Review of potential applications in neurosurgery. *Surg Neurol Int*. 2018;9:157.
34. Kono N, Arakawa K. Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. *Dev Growth Differ*. 2019 Jun;61(5):316-326.
35. Mitsuhashi S, Nakagawa S, Takahashi Ueda M, et al. Nanopore-based single molecule sequencing of the D4Z4 array responsible for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Sci Rep*. 2017 Nov 1;7(1):14789.