

DNA flitst door nanoporie

Nanoporiën kunnen DNA-sequensen eenvoudiger, goedkoper en draagbaar maken. Er zijn al apparaten op de markt. Toch zoeken bedrijven en universiteiten verder naar het ideale nanogaatje.

Begin maart maakte het Britse bedrijf Oxford Nanopore bekend dat het zijn nieuwe generatie DNA-sequencingmachines gaat uitrusten met een andere eiwitporie. Samenwerking met de groep van de Vlaamse structuurbioloog Han Remaut blijkt daarvoor cruciaal. De publicatie van Remauts groep van de Vrije Universiteit Brussel was voor het bedrijf reden om in 2014 te bellen. ‘Sindsdien is het verrassend snel gegaan van ons fundamenteel onderzoek naar een praktische toepassing’, zegt Remaut.

Eiwitporiën

Oxford Nanopore bouwt bacteriële poriën in zijn sequencingmachines, zoals de MinION, een draagbare sequencer ter grootte van een forse USB-stick. De eiwitporiën zitten daarin ingebed in een synthetisch polymeermembraan, waarover een kleine spanningsverschil staat dat een ionenstroom op gang brengt. Als een DNA-molecuul de porie passeert, wordt de ionenstroom afgeknepen of even onderbroken en dat vertaalt zich in een klein elektrisch signaal. Verschillende basen geven een karakteristieke verstoring van de ionenstroom, die je na de nodige databewerking kunt vertalen in een reeks van A, C, G en T.

Remaut was niet op zoek naar een betere sequensporie. Zijn fundamenteel onderzoek richt zich op de vraag hoe bacteriën zich hechten aan oppervlakken. Gram-negatieve bacteriën, zoals *E. coli*, scheiden voor het koloniseren van een oppervlak zogenoemde Curli-eiwitten uit met de

membraanporie CsgG. Omdat de porie voor het eiwittransport geen gebruikmaakt van ATP of andere cellulaire energiebronnen wilde Remaut de molecuulstructuur met röntgenkristallografie in kaart brengen.

Remaut: ‘Toen ik de structuur van de porie zag, realiseerde ik me dat het ook voor sequensen van DNA of RNA interessant kon zijn. Het kanaaltje in de porie heeft halverwege een vernauwing die optimale meeteigenschappen geeft. De porie is als het ware een nauw passende leeskop. Dat idee is getest, en met een aantal mutaties in de eiwitstructuur blijkt het inderdaad te werken.’

Met oog op mogelijke valorisatie diende Remaut vooraf aan zijn publicatie van dit werk in *Nature* in 2014 een octrooi-aanvraag in voor de sequencingtoepassing van een gemuteerde CsgG-porie. ‘Toen onze paper verscheen, nam Oxford Nanopore al snel contact op. Het realiseerde zich ook de mogelijkheden van deze porie’, zegt Remaut. Een samenwerkingsovereenkomst was snel getekend en het bedrijf zal licentiegelden gaan betalen. Op dit moment levert het contract Remaut een extra onderzoeker.

‘Theoretisch kan grafen afzonderlijke basen meten’

‘We gaan samen met het bedrijf kijken naar homologe poriën in andere bacteriesoorten en het effect van uiteenlopende mutaties. Het belangrijkste voor mijn fundamentele onderzoek is dat we gebruik kunnen maken van apparatuur van de fabrikant om de werking van het wild-type porie te bestuderen. Voorheen konden we in het lab handmatig niet meer dan enkele poriën per dag bekijken, nu kunnen we er honderden tegelijk bestuderen.’

Passagesnelheid

Binnen twee jaar heeft Oxford Nanopore de CsgG-porie op een flink aantal punten gemuteerd om de werking te optimaliseren. De verbeterde versie heet R9 en is afgestemd op de rest van de nanoporietechnologie, waaronder koppeling met een docking-enzym, dat dubbelstrengs DNA splitst in twee strengen en ze vervolgens stapsgewijs richting de porie-opening transporteert (zie illustratie). Het docking-enzym remt ook de DNA-streng. Zonder die tussenkomst valt er weinig te meten, want enkelstrengs-DNA heeft de neiging om met een tempo van meer dan een miljoen basen per seconde door de porie te schieten. In de MinION wordt het DNA daarom vertraagd tot zo’n 70 basen per seconde. Nieuwe versies met de R9 moeten richting de 250 à 300 basen per seconde aankunnen. Die apparaten zijn nu onderweg naar de markt.

In de praktijk bepalen commerciële nano-



porie-apparaten dan ook noodgedwongen het signaal van meerdere basen tegelijk, waarna uitgebreide data-analyse de afzonderlijke DNA-basen identificeert. De hoge passagesnelheid is een van de redenen waarom DNA-sequenties afkomstig van commerciële nanoporie-sequencers meer fouten bevatten dan DNA-analyse met meer traditionele apparaten.

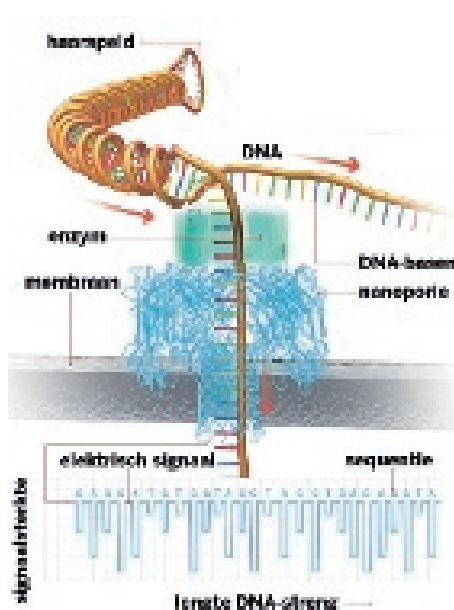
Al daalt dat foutenpercentage gestaag, analyses met die apparatuur moet je nog steeds vaker herhalen dan met de traditionele apparatuur om een betrouwbare DNA-sequentie te krijgen. Dat staat toepassing overigens niet in de weg: in februari verscheen een publicatie waarin een draagbaar nanoporie-instrument is gebruikt om de DNA-variantie van Ebola-virussen te inventariseren tijdens de uitbraak in West-Afrika.

Grafeenvariant

De nanotechnologie werkt, maar er is dus nog ruimte voor verbetering. Een deel van het fundamentele onderzoek richt zich op anorganische of *solid state*-nanoporiën, met technieken die lijken op de productie van halfgeleiders voor computerchips. Zo is op experimentele schaal DNA in kaart gebracht met een dunne membraan van siliciumnitride of aluminiumoxide, die met een elektronenbundel van een porie zijn voorzien.

Ook kijken onderzoekers uitgebreid naar

grafeen voor nanoporietoepassingen. 'Je kunt met grafeen heel sterke membranen maken, met poriën met een stabiele diameter', zegt technisch natuurkundige Stephanie Heerema, die bij het Kavli Instituut in Delft promotieonderzoek doet naar grafeennanoporiën voor DNA-sequencing. 'De productie van solid state-poriën is snel en flexibel: je kunt in principe het ontwerp aanpassen en als het goed werkt opschalen tot een enorm array met duizenden poriën. Dat kan deze technologie uiteindelijk sneller en goedkoper maken dan eiwitporiën.'



De eigenschappen van grafeen zijn daarbij extra interessant, aldus Heerema. 'Grafeen is elektrisch geleidend en de porie is net zo dun als de DNA-basen die je wilt meten. Theoretisch zouden we met grafeen dus afzonderlijke basen moeten kunnen meten.' Toch moet sequensen met grafeennanogaatjes nog flink wat stappen maken. 'Een probleem bij de ontwikkeling van alle solid state-poriën is dat er veel ruis in het meetsignaal zit en dat het DNA-molecuul erg snel door het gaatje beweegt. Als we dus met een grafeenporie de ionenstroom proberen te meten, kunnen we verschillende basen niet goed van elkaar onderscheiden.'

De voorbije jaren hebben theoretisch natuurkundigen berekend dat een andere meetmethode waarschijnlijk beter onderscheid kan maken. In plaats van de fluctuaties in de ionenstroom door de porie te meten, kun je ook kijken naar de geleiding van het grafeen zelf. Die verandert namelijk als je het DNA erdoor trekt. 'Theoretisch zou je de minieme verschillen in de stroompjes door het grafeen moeten kunnen meten als de verschillende basen passeren', vertelt Heerema. De vraag is wat het beste grafeenontwerp is waarmee je in de praktijk die stroompjes goed kunt waarnemen. Mogelijk is dat met een nanogaatje in een dun grafeenlintje of een grafeenstructuur waaraan de DNA-basen even blijven plakken.

DNA remmen

Een extra opgave is het DNA beteugelen, zodat het niet ongecontroleerd door het nanogaatje vliegt. Sommige onderzoekers proberen het DNA te remmen met ionische vloeistoffen, anderen met enzymen of met flexibele nanostructuren die het DNA tijdelijk vastgrijpen. Heerema besluit: 'Hoe sensitief kunnen we grafeensensoren maken? Stel dat we straks afzonderlijke basen goed kunnen meten, dan heb je ook al die databewerking achteraf niet meer nodig, die nu bij eiwitporiën noodzakelijk is. Ik denk dat er volop ruimte is voor porietechnologie die het DNA-sequensen nog sneller en nauwkeuriger kan maken.' ●

► **Meer nanotechnologie?** Op 21 juni vindt in Amsterdam NanoCity 2016 plaats. Kijk voor meer informatie op: www.nanocity2016.com