

Yeni Nesil Dizileme (YND) Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması)

The Known about Next-Generation Sequencing (NGS) (Review of the Literature)

Mustafa DOĞAN¹, Recep ERÖZ^{1*}, Hüseyin YÜCE¹, Recep ÖZMERDİVENLİ²

¹Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD, Düzce

²Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, Düzce

ÖZ

Yeni Nesil Dizileme (YND) yönteminin temeli DNA'nın enzimatik reaksiyonlarla kesilerek çok sayıda DNA parçasıyla bir kütüphane oluşturulması ve kütüphaneyi oluşturan DNA parçalarının çoğaltılmasına dayanmaktadır. OMIM istatistiklerine göre günümüzde 6000'den fazla tek gen hastalığı bulunmakta olup, bunların neredeyse üçte ikisinin moleküler temeli bilinmemektedir. YND platformlarının gelişmesine bağlı olarak birçok hastalığın moleküler temelini anlamasında büyük ilerlemeler kaydedilmeye başlanmıştır. YND teknolojileri ile tüm genom ve tüm ekzom dizilenmesinin yanısıra hedefe yönelik olarak oluşturulan YND panelleri ile etiyolojisi genetik heterojenite gösteren hastalıklar için çok sayıda gen aynı anda dizilenebilmektedir. Hastalıklara neden olan genetik etiyolojinin ortaya konması ile hastalara daha doğru genetik danışmanlık verilebilmekte, risk altında olan aile bireyleri hızlıca taranabilmektedir. Yeni nesil dizi analizlerinin gelişmesi ile birlikte fenotipik ve genotipik heterojenite gösteren hastalıkların genetik temelini ortaya konması mümkün olmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla YND ile ilgili şüana kadar yazılmış birkaç İngilizce derleme haricinde hiç Türkçe derleme yoktur. Bu nedenle bu derlemede YND ile ilgili bilinenler okuyuculara sunulmaya çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: YND; sekans; DNA dizi analizi.

ABSTRACT

The Next-Generation Sequencing (NGS) method is based on by forming a library with a plurality of DNA fragments by cutting the base DNA with enzymatic reactions and the amplification of DNA fragments constituting the library. According to OMIM statistics, there are now more than 6,000 single gene disorders and molecular basis of nearly two thirds of these disorder is unknown. A great deal of progress has begun to be made in understanding the molecular basis of many diseases depending on the development of NGS platforms. With NGS technology, in addition to whole genomes and whole exome sequencing, a large number of genes can be sequenced for the etiology of diseases with genetic heterogeneity using target-oriented NGS panels at the same time. With the description of genetic etiology that causes diseases, patients can be given more accurate genetic counseling and family members under risk can be quickly screened. It is possible to reveal the genetic basis of phenotypic and genotypic heterogeneous diseases with the development of new generation lineage analyzes. To the best of our knowledge, there are no Turkish review except for a few English review written about NGS so far. For this reason, it is tried to present to readers what is known about NGS in this review.

Keywords: NGS; sequence; DNA sequence analyzing.

GİRİŞ

Sanger ve ark. (1,2) 1977 yılında, 3'OH grubu dehidroksile edilmiş olan nükleotidleri (dideoksinükleotidler (ddNTP)) kullanarak DNA zincir uzamasının durdurulması prensibine dayalı bir DNA dizileme yöntemi geliştirmişlerdir. 1986 yılında Mullis ve ark. (3) tarafından temel olarak DNA'nın belirli bir bölgesinin in vitro olarak çoğaltılması işlemi olan PCR'in (Polimerase Chain Reaction) keşfinden sonra ise DNA dizi analizinin kullanımı iyice yaygınlaşmaya başlamıştır. Dizi analizi yönteminde ilk zamanlarda DNA sentezinin başlaması için DNA polimeraza bir başlangıç noktası oluşturmak amacıyla, bir uçundan radyoizotop ile işaretlenmiş primerler kullanılmaktayken, günümüzde bu radyoaktif parçaların insan sağlığı açısından oluşturacağı olumsuz etkileri azaltmak amacıyla floresan boyalarla işaretlenmiş primerler kullanılmakta ve görüntülemeler de buna uygun olarak geliştirilmiş bilgisayar sistemleri tarafından otomatik olarak yapılmaktadır. Floresan boyayla işaretli dideoksi nükleotid trifosfatlar (ddNTP)'rın kullanıldığı Sanger

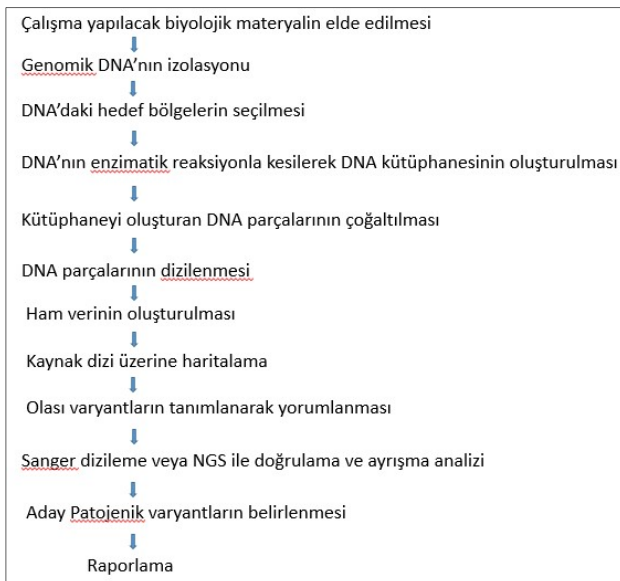
Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Recep ERÖZ, eroz38r@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 05.10.2017 Kabul Tarihi / Accepted: 07.12.2017

yöntemiyle çok sayıda örnek aynı anda dizilenebilmekte, her bir yürütmeye 400-800 bazlık bir uzunluğa sahip olan DNA dizileri yüksek doğrulukla okunabilmektedir. Bu yöntem günümüze kadar en çok kullanılan DNA dizileme yöntemi olmuştur (4,5). Sanger dizileme ve floresan tabanlı elektroforez teknolojileri kullanılarak insan DNA dizisinin büyük çoğunluğu tanımlanmıştır. 2003 yılında sonuçları paylaşılmaya başlanan İnsan Genom Projesinin büyük bir kısmı, Sanger dizileme cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Proje kapsamında çalışılan ve ilk tamamlanan insan genom dizilemesi, 10 yıllık bir süre sonunda yaklaşık 3 milyar dolarlık bir maliyetle tamamlanmıştır (6). İnsan genom projesinin bitirilmesi ile birlikte yeni nesil dizileme (YND) olarak adlandırılan masif paralel dizileme yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Yeni Nesil Dizileme yönteminde kullanılan ilk Next Generation Sequencing (NGS) cihazı ise 2005 yılında kullanıma sunulmuştur (7). Bu tarihten itibaren geliştirilen NGS platformları ile birlikte moleküler genetik alanında bir çığır aşılmıştır. Geçtiğimiz son on yılda ortaya çıkmış yüksek verimli dizileme teknolojileri dahil olmak üzere kullanımı giderek artan çeşitli moleküler yöntemler bir çok alanda ilerlemenin önünü açmıştır.

ÇALIŞMA PRENSİBİ

Yeni Nesil Dizileme (YND) yönteminin temeli DNA'nın enzimatik reaksiyonlarla kesilerek çok sayıda DNA parçasıyla bir kütüphane oluşturulması ve kütüphaneyi oluşturan DNA parçalarının çoğaltılmasına dayanmaktadır. Milyonlarca küçük DNA parçasının paralel sekanslama ile eş zamanlı olarak dizilenmesi gerçekleştirilmekte; bu sayede genomdaki her bir bazın birden çok kez okunması mümkün olmakta ve varyasyonlar daha doğru bir şekilde tespit edilebilmektedir (8). Sistem ana hatlarıyla; Çalışma yapılacak biyolojik materyalin elde edilmesi, Elde edilen biyolojik materyallerden genomik DNA'nın izolasyonu, İzole edilen DNA'daki hedef bölgelerin seçilmesi, DNA'nın enzimatik reaksiyonla kesilerek DNA kütüphanesinin oluşturulması, Kütüphaneyi oluşturan DNA parçalarının çoğaltılması, DNA parçalarının dizilenmesi, Dizileme sonrası ham verinin oluşturulması, Kaynak dizi üzerine haritalama, Olası varyantların tanımlanarak yorumlanması, Sanger dizileme veya NGS ile doğrulama ve ayrışma analizi, Aday Patolojik varyantların belirlenmesi raporlanması basamaklarından oluşmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. YND'nin akış şeması

Günümüzde farklı dizileme yöntemi kullanan NGS platformları mevcuttur. Bugün tüm dünyada YND sistemleri olan Illumina Miseq, SOLID, Ion Torrent, Roche 454, Pacific Biosciences yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu platformlarda ortak olarak çalışma aşamaları DNA kütüphanesi oluşturma, dizileme, görüntüleme ve elde edilen verilerin analizi basamaklarını kapsamaktadır. Illumina platformunda, enzimatik aşamalar ve görüntüleme işlemlerinin hepsi "flow cell" adı verilen kısımda gerçekleştirilmektedir. "Flow cell" yüzeyinde köprüleşen PCR tekniği kullanılarak çoğaltılan klonal DNA parçaları daha sonra LED ve filtreler yardımıyla 4 farklı floresan renk oluşumunu sağlayan reversibl terminatörler kullanılarak sanger dizilemeye benzer bir şekilde senteze dayalı olarak dizilenmektedir (sequencing by synthesis). Cihaz farklı dalga boylarındaki her bir rengi ayrı ayrı algılayarak analiz edilen DNA parçasının nükleotid dizilimini ortaya koymaktadır (8-11).

KULLANIM ALANLARI

OMIM istatistiklerine göre günümüzde 6000'den fazla tek gen hastalığı bulunmakta beraber bunların neredeyse üçte ikisinin moleküler temeli bilinmemektedir (12). Tüm genom, tüm ekzom dizileme yöntemleri özellikle nadir hastalıklara neden olan mutasyonların tanısında, yeni genlerin keşfinde, fenotipik ve genotipik olarak heterojenite gösteren hastalıkların tanısında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (13-16). Tüm ekzom dizileme ile sadece proteine çevrilen bölgelerin dizilenmesi amaçlanmakta, tüm genom dizileme ile insan genomunun tamamını oluşturan 3.2 milyar baz çifti NGS teknolojisi sayesinde günümüzde 1 günde dizilenebilmektedir (17). Mendeliyen hastalıklar için patojenik varyantların yaklaşık olarak %85'inin ekzonlarda veya ekzon-intron birleşme bölgelerinde bulunmasından dolayı; tüm kodlayan bölgeleri %95'ten daha fazla bir kapsayıcılıkla okuyabilen WES (whole exome sequencing) Mendelian hastalıklara neden olan genlerin tespit edilmesinde çok önemli bir analiz yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanında WES ile çoğu hastalığa yatkınlık oluşturduğu ortaya konmuş genomda yaygın olarak bulunan tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphism; SNP)'lerinin tespiti de mümkün olmaktadır. WES'in maliyeti tüm genom dizilemeye göre çok daha ucuz olmakla birlikte tüm genom dizileme; intronik ve intergenik bölgelerdeki değişiklikler ile insersiyon, delesyon ve translokasyonlar gibi yapısal varyantları çok daha duyarlı tespit edebilmektedir. Günümüzde tüm genom sekanslama maliyeti teknolojinin gelişmesine bağlı olarak 1000 dolar civarına kadar düşmüştür (8,11-13,18-21).

NGS teknolojileri ile tüm genom ve tüm ekzom dizilenmesinin yanısıra hedefe yönelik olarak oluşturulan YND panelleri ile etyolojisi genetik heterojenite gösteren hastalıklar için çok sayıda gen aynı anda dizilenebilmektedir. İmmun yetmezlikler, kemik iliği yetmezliği ile giden sendromlar, nörolojik hastalıklar, renal hastalıklar, bağ doku hastalıkları, kanser yatkınlık sendromları, kardiyomiyopatiler, işitme kaybı ve körlük etiyolojisi vb taramak amacıyla oluşturulan paneller günümüzde çalışılmaktadır (22). NGS teknolojileri prenatal tanı ve serbest fetal DNA (cffDNA, cell-free fetal DNA) analizlerinde de kullanılmaktadır (23). Kanserli bir hastada, hastalığın tüm aşamalarında dolaşım sistemine malign hücrelerin salınmakta olduğu gerçeğinden hareketle özellikle 1990'lı yıllardan itibaren dolaşımdaki tümör hücrelerinin veya serbest dolaşan DNA parçacıklarının invaziv olmayan tetkiklerle elde edilebilmesi için çalışmalar yapılmaya başlanmış, günümüzde "likit biyopsi" olarak uygulanan bu yöntemler hasta ve doktorlara tanı/tedavi yaklaşımlarında önemli seçenekler sunmaya başlamıştır (24). Yeni nesil dizi analizleri sayesinde neoplastik hücrelerin genetik/epigenetik özellikleri belirlenerek hematolojik kanserler başta olmak üzere akciğer, meme, pankreas gibi ulaşılması güç olan solid doku kanserlerinin erken tanısı, bireysel tedavi yaklaşımlarının oluşturulması ve hastaların tedaviye olan yanıtlarının izlenmesi daha doğru bir şekilde saptanabilir hale gelmiştir (25-27).

Günümüzde NGS teknolojisi; transkriptom dizileme ve epigenetik çalışmalar dahil birçok alanda kullanılmakta olup; ayrıca kromatin yapısı ve metilasyon paterni çalışmalarında, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin karakterizasyonu, mRNA profili çıkarılması, ekspresyon çalışmaları için RNA dizileme, atasal DNA'yı araştırmak ve metagenomik araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır (28). Ayrıca mikrobiyolojide hastalığa yol açan mikroorganizmaların genomları dizilenebilmekte, adli tıpta ve pek çok temel bilim alanında farklı NGS uygulamaları kullanıma girmektedir (10).

SANGER DİZİMEYE KARŞI YENİ NESİL DİZİLEME

Geleneksel Sanger dizileme yöntemiyle substitüsyonlar, küçük insersiyonlar ve delesyonların tespiti kısıtlı olduğundan submikroskopik delesyonlar, kopya sayısı değişikliklerinin tespiti için çoğu zaman FISH, microarray, array-CGH analizleri yapmak gerekmektedir. Bununla birlikte farklı biyoinformatik algoritmalar kullanılarak NGS yöntemiyle tüm bu verileri tek bir seferde elde etmek mümkün hale gelmektedir. Sanger dizileme bugün hala DNA dizi analizi için altın standart yöntem olarak kabul edilse de, sonuç verme süresinin uzun olması ve maliyetin pahalı olması gibi dezavantajlara sahiptir. Son yıllarda gelişen yeni nesil dizileme teknolojisi ile yüksek miktarda verinin hızlı bir şekilde ve düşük maliyetle analizi yapılabilmektedir (17,29). Dr. Biesecker ve ark. (30)'nın 2016 yılında gerçekleştirdikleri araştırma sonucu DNA dizi varyantlarının doğruluğunu kontrol etmek amacıyla kullanılan Sanger dizilemenin NGS'ye göre daha fazla hata yaptığı ortaya konmuştur. Yine klinik kullanımda pozitif NGS bulgularını doğrulamak amacıyla en sık başvuru olan yöntem olan Sanger dizilemenin uzun sürede sonuç vermesi ve yüksek maliyetlerine kıyasla NGS'nin daha doğru ve güvenilir sonuçlar verdiği gösterilmiştir.

NGS yöntemlerinin avantajı aynı anda milyonlarca kısa DNA parçasının dizilenebilmesi ve sonrasında bu dizilerin elektroforeze ihtiyaç duyulmaksızın direk olarak okunabilmesidir. Bu teknolojinin dezavantajı ise göreceli olarak kısa okumalar yapmasıdır. Okunan bu kısa parçaların genoma doğru bir şekilde hizalanması gerekmekte bu konuda özel algoritmalara ihtiyaç duyulmaktadır (21). Ayrıca bazı bölgeler aşırı guanin / sitozin (GC) içeriğinden dolayı yanlış sıralanmakta veya hatalı dizilenebilmekte yine tekrar bölgelerinde cihaz okuma hataları yapılabilmektedir. Klinik kullanımda NGS'nin bir diğer dezavantajı ise kapasite ve depolama özelliği oldukça gelişmiş bilgisayar sistemlerine ve verileri kapsamlı bir şekilde yorumlayabilecek uzman personellere ihtiyaç duymasındır.

Gelişen teknolojiyle beraber yeni nesil dizi analizlerinde önmüzdeki süreçlerde nanoporların dizilemede kullanılacağı öngörülmektedir. Bu teknik dört farklı nükleotide karşılık gelen akım değişikliklerinin belirlenerek nanoporlardan geçen DNA dizisinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile yakın zamanda ekzonükleazlar tarafından kesilen bazı herhangi bir polimerizasyona gerek duyulmadan nanoporlardan geçirilerek çok kısa süreler içerisinde tüm genom analizinin yapılabilmesi planlanmakta ve maliyetlerin de düşük olması beklenmektedir. Bu konuda çalışmalar sürmektedir (31,32). Hastalıklara neden olan genetik etiyolojinin ortaya konması ile hastalara daha doğru genetik danışmanlık verilebilmekte, risk altında olan aile bireyleri hızlıca taranabilmektedir. Böylece DNA dizileme yöntemi kullanılarak genetik temeli olan çeşitli hastalıkların başarılı bir şekilde tanımlanması yapılabilmektedir (33-40). Hastalara uygulanacak tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesinde genetik tanının önemi büyüktür; yakın gelecekte genetik tedavilerin de uygulamaya gireceği öngörülmektedir. Günümüzde moleküler genetik tanı sayesinde ailelere erken prenatal tanı ve PGD (preimplantasyon genetik tanı) imkanları sunulmaktadır. Geleneksel yöntemlerle çok sayıda etkilenmiş bireye sahip geniş aileler olmadan penetransı düşük, ekspresivitesi değişken, genetik heterojenite gösteren hastalıklara sebep olan genetik altyapıyı ortaya koymak ve bu tür ailelere genetik danışmanlık vermenin zorluklarına kıyasla yeni

nesil dizi analizlerinin gelişmesi ile birlikte fenotipik ve genotipik heterojenite gösteren hastalıkların genetik temelini ortaya konması mümkün olmaktadır (13,41,42).

KAYNAKLAR

1. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975;94(3):441-8.
2. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1977;74(12):5463-7.
3. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51(Pt 1):263-73.
4. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008;456(7218):53-9.
5. Bagirova G. Fanconi anemili olgularda ilişkili genlerin yeni nesil dizileme teknolojisi ile taranması ve mutasyonların saptanması [Uzmanlık Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı; 2016.
6. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 2004;431(7011):931-45.
7. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005;437(7057):376-80.
8. Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2014;1842(10):1932-41.
9. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012;2012:251364.
10. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics.* 2014;30(9):418-26.
11. White SJ, Laros JFJ, Bakker E, Cambon-Thomsen A, Eden M, Leonard S, et al. Critical points for an accurate human genome analysis. *Human Mutation.* 2017;38(8):912-21.
12. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J Hum Genet.* 2014;59(1):5-15.
13. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genetics.* 2017;18:14.
14. Fukami M, Miyado M. Next generation sequencing and array-based comparative genomic hybridization for molecular diagnosis of pediatric endocrine disorders. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;22(2):90-4.
15. Volk AE, Kubisch C. The rapid evolution of molecular genetic diagnostics in neuromuscular diseases. *Curr Opin Neurol.* 2017;30(5):523-52.
16. Schang AL, Sabéran-Djoneidi D, Mezger V. The impact of epigenomic Next Generation Sequencing approaches on our understanding of neuropsychiatric disorders. *Clin Genet.* 2018;93(3):467-80.
17. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-8.
18. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet.* 2011;48(9):580-9.
19. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet.* 2012;57(10):621-32.
20. Weymann D, Laskin J, Roscoe R, Schrader KA, Chia S, Yip S. The cost and cost trajectory of whole-genome analysis

- guiding treatment of patients with advanced cancers. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. 2017;5(3):251-60.
21. Taşlıdere H. Mental retardasyon ve/veya multipl konjenital anomalili olguların Yeni Nesil Dizileme Tekniği ile genetik etiyojisinin araştırılması [Uzmanlık Tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı; 2016.
 22. Liu YT, Lee YC, Soong BW. What we have learned from the next-generation sequencing: Contributions to the genetic diagnoses and understanding of pathomechanisms of neurodegenerative diseases. *J Neurogenet*. 2015;29(2-3):103-12.
 23. Lefkowitz RB, Tynan JA, Liu T, Wu Y, Mazloom AR, Almasri E, et al. Clinical validation of a noninvasive prenatal test for genomewide detection of fetal copy number variants. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(2):227.e1-227.e16.
 24. Kulaç İ. Sıvı biyopsi: dolaşımdaki tümör hücreleri kavramı ve prostat kanseri hastalarının takip/tedavisindeki önemi. *Üroonkoloji Bülteni*. 2014;13(4):196-200.
 25. Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med*. 2017;141(11):1544-57.
 26. Thompson JC, Yee SS, Troxel AB, Savitch SL, Fan R, Balli D, et al. Detection of therapeutically targetable driver and resistance mutations in lung cancer patients by next generation sequencing of cell-free circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res*. 2016;22(23):5772-82.
 27. Ai B, Liu H, Huang Y, Peng P. Circulating cell-free DNA as a prognostic and predictive biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(28):44583-95.
 28. Bahsi T. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının araştırılmasında yeni nesil moleküler yöntem sonuçlarının konvansiyonel dizi analizi yöntemi ile karşılaştırılması [Uzmanlık Tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı; 2014.
 29. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of next-generation DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(7):887-900.
 30. Benowitz S. New study challenges gold standard for validating DNA sequencing results: Findings suggest newer next generation DNA sequencing results are more accurate [Internet]. National Human Genome Research Institute. [Updated: 2016 March 28; Cited: 2016 March 29]. Available from: <https://www.genome.gov/27564480/2016-news-feature-new-study-challenges-gold-standard-for-validating-dna-sequencing-results/>.
 31. Ku CS, Roukos DH. From next-generation sequencing to nanopore sequencing technology: paving the way to personalized genomic medicine. *Expert Rev Med Devices*. 2013;10(1):1-6.
 32. Schneider GF, Dekker C. DNA sequencing with nanopores. *Nat Biotechnol*. 2012;30(4):326-8.
 33. Eroz R, Dogan M, Kocabay K. A novel mutation K447m (P.Lys447met, C.1340 A>T) identified in exon4 of the MEFV gene. *Genetic Counselling*. 2016;27(4):525-8.
 34. Akaltun A, Eroz R, Dogan M, Bolu S, Onder HI, Onbas O, et al. Basal cell nevus (gorlin) syndrome with a novel heterozygous deletion frameshift mutation (C.959delc, P.Val322 Phe Fsx2) in the Ptch1 gene associated with epiretinal membrane, odontogenic keratocysts and without skin lesions and falx cerebri calcification. *Genet Couns*. 2016;27(2):259-62.
 35. Soysal Z, Okur M, Eroz R, Gun E, Kocabay K, Besir FH. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts with homozygous mutation (C.448delc, P.Leu150 Ser Fsx11) on exon 6 of Mlc1 gene. *Genet Couns*. 2015;26(2):233-6.
 36. Okur M, Eroz R, Mundlos S, Senses DA, Ulgen E, Ismailler ZB, et al. EEC syndrome with a denovo mutation (c.953g>a) on exon 7 of p63 gene: a case report. *Genet Couns*. 2012;23(4):483-5.
 37. Eroz R, Dogan M, Yuce H, Ozmerdivenli R. A family from Turkey with 761_764dupCCGC p.Asn256Argfs70, c.761_764dupCCGC MEFV gene mutation, their clinical features and review of the literature. *Konuralp Medical Journal*. 2016;8(3):214-7.
 38. Eroz R, Dogan M, Yuce H, Kocabay K, Yuksel E. A Turkish family with A89T (p. Ala89Thr, c.265G>A) mutation on the MEFV gene, their clinical findings and review of the literature. *FÜ Sağ Bil Tıp Derg*. 2016;30(2):67-70.
 39. Bolu S, Eroz R, Dogan M, Arslanoglu I, Gun E, Yuce H. A Novel p.Arg179Ser (c.537 G>T) heterozygotes mutation on exon 3 of SRD5A2 gene accompany with biotinidase deficiency in case with ambiguous external genitalia. *Konuralp Medical Journal*. 2017;9(3):102-6.
 40. Eroz R, Dogan M, Bolu S, Yuce H. A seven years old girl with Klippel-Feil Syndrome, bilateral sprengele deformity, congenital unilateral renal agenesis and a heterozygous mutation M680I(G>C) in the MEFV gene. *Konuralp Medical Journal*. 2017;9(2):90-3.
 41. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013;155(1):27-38.
 42. Atık T. Nonsendromik işitme kayıplarında hedeflenmiş yeni nesil dizi analizi ile genetik etiyojinin belirlenmesi [Doktora Tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Genetik Doktora Programı; 2016.