Chemische Feitelijkheden

editie 46 | nr 214 | februari 2005

DE CONTEXT Chips voor biowetenschap
DE BASIS Duizenden vliegen in één klap
DE DIEPTE Een duik in de data

AUTEUR: ARTHUR VAN ZUYLEN

DNA-CHIPS

Met duizenden tegelijk...

Vroeger dacht je bij chips aan aardappelen. Later kwamen daar de computerchips bij en de jongste loot aan de stam zijn DNA-chips. Het zijn plaatjes van glas of kunststof volgepakt met verschillende stukjes DNA. Hiermee kunnen duizenden genen tegelijk worden bekeken. De ontcijfering van het humane genoom bracht de ontwikkeling van DNA-chips in een stroomversnelling. In de jaren negentig ontketenden de eerste artikelen een ware hype. Wetenschappers buitelden over elkaar heen met ideeën over potentiële toepassingen, vaak nogal speculatief. Nog niet alle verwachtingen zijn waargemaakt, maar dat doet niets af aan de kracht van de DNA-chips. Voor medici en biologen zijn ze een veelgebruikt gereedschap geworden in celbiologisch onderzoek. Behalve voor genetisch onderzoek bij mensen, dieren en planten of bij de diagnostiek en screening van ziekten zijn DNA-chips ook op vele andere terreinen inzetbaar. Bijvoorbeeld voor het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen en het opsporen van schadelijke organismen. Of in politie-onderzoek om de identiteit van daders te achterhalen en in de moderne voedingsmiddelen-technologie om gezondheidseffecten van nieuwe ingrediënten te voorspellen.

In deze Chemische Feitelijkheid

- De Context: Wat zijn DNA-chips en wat kun je ermee? Waar en door wie worden ze gebruikt.
- De Basis: Hoe maak je ze en hoe werken ze? Zelf maken of kant-en-klaar kopen?
- De Diepte: Over bioinformatica en computertechnieken om immense datastromen te analyseren. Wat zijn toekomstige ontwikkelingen?

Foto: Affymetrix

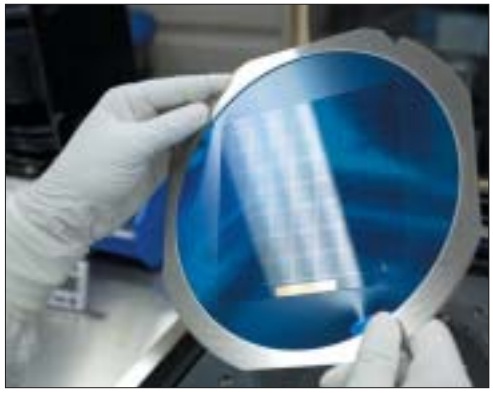
De komst van elektronische chips zorgde voor een omwenteling in de computertechnologie. DNA-chips hebben sinds begin jaren negentig een soortgelijke ommezwaai veroorzaakt binnen het medisch-biologisch onderzoek.

Chips voor biowetenschap

Stel dat er geen computers bestonden. Brieven of artikelen zouden op een ouderwetse typemachine worden getikt, rekensommen zouden op papier worden gemaakt en er zou geen internet of e-mail zijn – laat staan andere alledaagse technologieën. Gelukkig zijn in de vorige eeuw computerchips uitgevonden, want zonder PC zouden de meeste moderne mensen zich in het Stenen Tijdperk wanen.

Hetzelfde verhaal gaat op voor DNA-chips. Voor veel moleculaire wetenschappers en genetische onderzoekers zou het tegenwoordig bijna ondenkbaar zijn om zonder DNA-chips te moeten werken. Dankzij deze techniek kunnen onderzoekers in minder tijd méér gegevens verzamelen. Kostte een reeks experimenten voor een genetische studie vroeger vele weken of maanden tijd, nu heeft men binnen een dag hetzelfde resultaat.

Die snelheid is misschien niet eens het grootste voordeel. Minstens zo belangrijk is dat onderzoekers via DNA-chips kunnen kijken naar het gedrag van een groot aantal genen tegelijk, terwijl ze met klassieke DNA-analyses slechts zicht hadden op één gen. Belangrijk, omdat inmiddels vaststaat dat veel ziekten niet door één enkele genafwijking worden veroorzaakt. Juist het samenspel van corrigerende en slecht functionerende genen blijkt beslissend of een bepaalde aandoening – bijvoorbeeld een kwaadaardige kanker – al of niet ontstaat.



Biowetenschappers beperken zich daarom niet langer tot afzonderlijke genen of eiwitten, maar hebben zich overgegeven aan de zogeheten systeembiologie. Zij richten zich op moleculaire routes die processen in het lichaam reguleren door afwisselend gas te geven en te remmen. Dit gebeurt door in bepaalde lichaamscellen genen 'aan' en 'uit' te zetten, ofwel ze al dan niet te activeren. De activiteit van genen is meetbaar met DNA-chips en daarom vormen de chips een prima gereedschap voor onderzoek aan complexe routes in lichaamscellen.

De opmars van de systeembiologie is versterkt door het *Human Genome*-project, dat in 2003 het complete menselijke genoom in kaart heeft gebracht. Dankzij dit project is de volgorde bekend van de miljarden bouwstenen van ons DNA. Maar dat is niet genoeg. We kennen daarmee alleen nog maar de code van het DNA en dat is hetzelfde als het woordenboek van een taal. De volgende stap is om alle woorden een betekenis te geven en de grammatica van de taal te achterhalen: wat doen al die genen precies en hoe beïnvloeden ze elkaar? DNA-chips zijn hierbij prima gereedschap.

SUCCESSEN

De eerste – experimentele – DNA-chips dateren van begin jaren negentig, maar pas vanaf 1996 raakte het onderzoek wereldwijd in een stroomversnelling doordat commerciële chips op de markt kwamen. Het aantal wetenschappelijke publicaties binnen het vakgebied is sindsdien nauwelijks meer te tellen.

Nederland doet internationaal gezien zeer goed mee: een aantal universiteiten (Rotterdam, Leiden, Amsterdam en Wageningen) heeft bijvoorbeeld speciale expertisecentra voor DNA-chips opgericht, waarin onderzoekers uit verschillende disciplines samenwerken. Een drijvende kracht hierachter is het Nationaal Regie-Orgaan Genomics, waarmee de

SYNONIEMEN

WHAT'S IN A NAME?

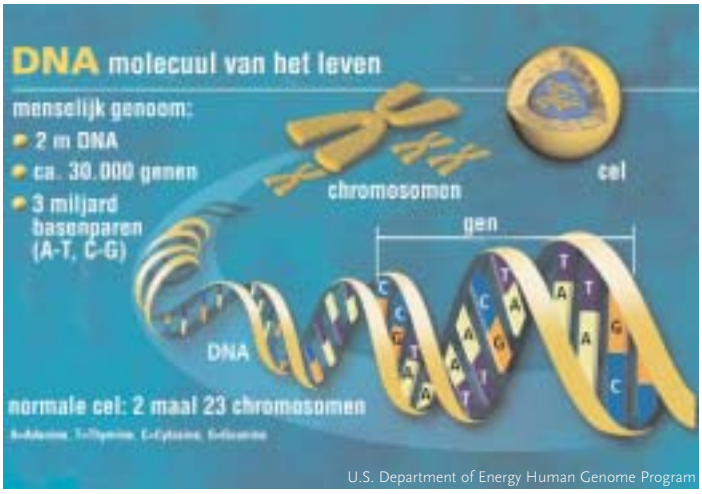
Zowel in de wetenschappelijke literatuur als in het spraakgebruik wemelt het van de termen voor één en dezelfde technologie: *DNA-chips, genchips, DNA-arrays, micro-arrays, macro-arrays* – of combinaties daarvan. Wat is nu eigenlijk wat?

Complicerende factor hierbij is dat de marktleider in deze bedrijfstak (het Amerikaanse Affymetrix, dat circa 70 procent van de markt in handen heeft) de naam 'DNA-chip' heeft gepatenteerd. Fabrikanten die een soortgelijke techniek verkopen moeten dit dus doen onder een andere merknaam. Vandaar de soms Babylonische spraakverwarring.

In de praktijk worden de verschillende namen vaak door elkaar gebruikt, maar strikt genomen zijn er wel verschillen. Micro- en macro-arrays worden gemaakt met behulp van 'printertechnologie', terwijl voor de productie van DNA- en genchips meestal fotolithografische technieken worden gebruikt (zie p 4-5). Door het grovere printproces passen op een array 'slechts' enkele tienduizenden DNA-fragmenten, terwijl op een chip vele honderdduizenden DNA-fragmenten passen. |

overheid Nederland een leidende rol wil laten spelen binnen het genoomonderzoek. Liefst vijf ministeries steken per jaar gezamenlijk tientallen miljoenen euro's in dit initiatief.

Die inspanningen blijken niet voor niets. In januari 2002 haalden onderzoekers van het Nederlands Kanker Instituut in Amsterdam bijvoorbeeld *Nature* met een publicatie over het gebruik van DNA-chips om te voorspellen hoe groot de kans is dat vrouwen die borstkanker hebben gehad daar opnieuw last van krijgen. Patiënten met een kleine kans op uitzaaiing kunnen volstaan met een lichte hormoonkuur, terwijl anderen zware chemotherapie moeten ondergaan (zie p 6-7).



U.S. Department of Energy Human Genome Program

STRUIKELBLOK

Hoewel DNA-chips net als computerchips voortdurend beter en goedkoper worden, kleeft er aan de nieuwe technologie nog steeds een groot nadeel: de éénmalig te gebruiken chips zijn bijzonder duur. Daardoor lijken ze voorlopig alleen voorbehouden aan grote onderzoeksinstituten en academische centra. Voor kleine 'perifere' ziekenhuizen zijn de chips geen haalbare kaart, al was het maar omdat er ook bijzonder krachtige – en dus dure – computers nodig zijn om de enorme hoeveelheid meetgegevens te verwerken en te analyseren. Medici dromen desondanks al van het zogeheten 'laboratorium-op-een-chip': in plaats van allerlei losse diagnostische tests zou je dan met één bloed- of weefselmonster een DNA-profiel kunnen maken voor allerlei aandoeningen en klinische parameters.

De toepassingsmogelijkheden van de chips gaan natuurlijk veel verder dan de kliniek. Zo kunnen farmaceuten via de chiptechnologie achterhalen of nieuwe medicijnen onverhoopt ongewenste bijwerkingen hebben. Het Amerikaanse Rosetta Inpharmatics bepaalt bijvoorbeeld de invloed van potentiële aidsremmers op de lever door via DNA-chips de activiteit van genen in blootgestelde levercellen te vergelijken met de activiteit in gezonde én beschadigde levercellen.

Andere praktische toepassingen zijn het achterhalen van de herkomst van levend vee of geïmporteerd vlees, waarbij het mogelijk is om met de DNA-chip een soort genetische vingerafdruk te maken. Ook in de plantenwereld hebben de chips inmiddels hun intrede gedaan. Zo hebben onderzoekers van Wageningen Universiteit dankzij DNA-chips een gen gevonden dat cruciaal is bij de vorming van smaakstoffen in fruit. De Wageningse onderzoekers volgden de rijping van aardbeien en keken of er in groene aardbeien misschien andere genen aan- of uitgeschakeld staan dan in rijpe rode aardbeien. Dat bleek inderdaad het geval en zo kwamen zij op het spoor van het gen dat codeert voor een enzym (alcohol acyltransferase) dat een essentiële omzettingsreactie regelt bij de aanmaak van smaakstoffen. Dit enzym speelt niet alleen in aardbeien een rol, maar ook in andere fruitsoorten. Een andere Wageningse studie op het gebied van DNA-chips gaat over het blootleggen van een 'genetische klok' in irissen. In de verschillende groeistadia van dit siergewas blijken telkens andere genen actief; wanneer die activiteit van betrokken genen meetbaar zou zijn, kan op een veiling de kwaliteit (lees: houdbaarheid) van de snijbloemen worden voorspeld.

Tot slot een actueel onderwerp. Zelfs in de terreurbestrijding kan de DNA-technologie van pas komen. Met DNA-chips valt vrij eenvoudig een genprofiel van de *antrax*-bacterie (miltvuur) te maken, waardoor bij een onverhoopte aanslag met zo'n biowapen de oorsprong van de bacterie achterhaald kan worden. Nu nog een utopie, maar het geeft wel aan dat DNA-chips een florissante toekomst hebben in vrijwel elke tak van de biowetenschappen. |

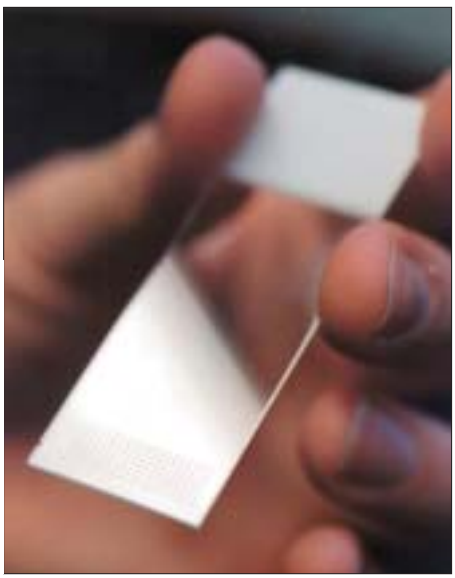


Foto: WUR

GENETISCH ALFABET

COMPUTERCHIPS EN DNA-CHIPS

Qua naam lijken computerchip en DNA-chip op elkaar, maar daarmee houdt de vergelijking eigenlijk op. Het enige wat ze gemeenschappelijk hebben is een vaste drager van silicium (computer) of glas/kunststof (DNA). In beide gevallen is het oppervlak bewerkt om gegevens te meten en te verwerken. Een computerchip is in feite heel 'dom', want die kent slechts nullen en enen. Zo'n chip bestaat uit een gigantische verzameling minuscule elektronische schakelaartjes die onderling verbonden zijn en die naar believen aan- of uitgezet kunnen worden. Op die manier vormen ze enen en nullen die gebruikt worden om bijvoorbeeld gegevens op te slaan of om te rekenen. Bij een DNA-chip daarentegen is het oppervlak bewerkt met stukjes DNA. Die herkennen het genetisch alfabet dat bestaat uit de vier letters A, C, G en T. Deze letters staan voor adenine, cytosine, guanine en thymine – de vier losse bouwstenen van het DNA. De aaneengeschakelde DNA-bouwstenen, ook wel basen genoemd, vormen lange enkelvoudige ketens die twee-aan-twee aan elkaar koppelen. Hierdoor ontstaat de bekende dubbele DNA-helix. De verbinding tussen twee ketens is zeer hecht doordat de basen onderling paren vormen: alle adenines koppelen aan thymines (A-T), terwijl de cytosines aan de guanines gaan vastzitten (C-G). Twee losse DNA-ketens zullen altijd op die manier aan elkaar willen koppelen ofwel 'hybridiseren'. Op deze hybridisatie is de werking van DNA-chips gebaseerd. |

DNA-chips bestaan uit een vaste drager, meestal glas, van een duimnagel groot. De drager is volgepakt met duizenden stukjes DNA die werken als een soort vliegenvangers. Maar dan stukken slimmer.

Duizenden vliegen in één klap

DNA-chiptechnologie is gebaseerd op het biologische principe dat de stukken enkelstrengs DNA op de chip koppelen met een zogeheten complementaire streng DNA in het monster. Deze 'hybridisatie' vindt alléén plaats als er sprake is van een *perfect match*. Dat wil zeggen tegenover adenine (A) komt thymine (T) en tegenover cytosine (C) komt guanine (G). Als in het materiaal dat wordt onderzocht, een stukje DNA voorkomt dat precies past op een fragment enkelstrengs DNA op de chip dan wordt dat stukje 'gevangen'. Zo zal een stukje DNA dat bestaat uit de basen AACCGGTT wél binden met een fragment waarin TTGGCCAA voorkomt, maar bijvoorbeeld niet met een fragment dat bestaat uit TAGTCTAT. Doordat precies bekend is wélke stukken DNA op welke plek van een DNA-chip zitten, kan met de chips informatie worden vergaard over alle fragmenten die eraan koppelen – en daarmee over de cellen, organen of organismen waaruit dat DNA afkomstig is.

Hamvraag daarbij is wat een onderzoeker precies wil meten. Gaat het om het bepalen van de volgorde van het DNA in 'zieke' of gezonde genen? Of gaat het juist om het meten van de expressie – de activiteit – van genen? Dit maakt veel verschil. In het eerste geval bevat een chip talloze kleine stukjes enkelstrengs DNA van maximaal 20 basen, zogeheten oligo's waarvan de samenstelling en volgorde (bijvoorbeeld ACGT) exact bekend is. Op die manier kan worden achterhaald of de volgorde van het DNA dat wordt onderzocht al dan niet overeenkomt met de volgorde van het DNA op de chip. Hiermee kan bijvoorbeeld worden aangetoond of specifieke DNA-volgorden voorkomen in mensen met een bepaalde ziekte en niet in gezonde mensen. Of omgekeerd natuurlijk.

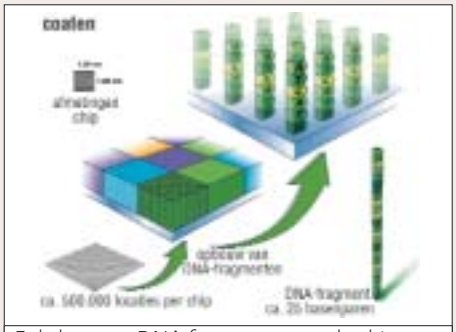
In het tweede geval gaat het om het meten van genactiviteit. Als een gen actief is, wordt het 'afgelezen'. Dat wil zeggen dat een stukje DNA wordt gekopieerd. Die kopie, het zogeheten boodschapper-RNA, zorgt ervoor dat het eiwit wordt gesynthetiseerd dat voor de genactiviteit nodig is. Aanwezigheid van boodschapper-RNA is dus een signaal dat het bijbehorende gen actief is. Met behulp van een DNA-chip kan worden onderzocht of het boodschapper-RNA aanwezig is in het te onderzoeken materiaal. Hiermee kan dus worden achterhaald of een gen 'aan' of 'uit' staat.

INKTJETPRINTER

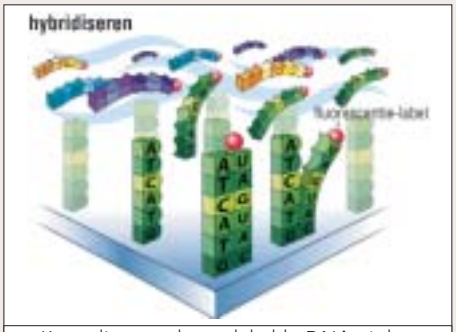
De basis van een DNA-chip wordt letterlijk en figuurlijk gevormd door een drager. Meestal bestaat dit dragermateriaal uit glas (siliciumoxide), maar kunststoffen zoals nylon zijn eveneens gangbaar en er bestaan ook chips met een ondergrond van keramiek. Op deze drager worden de fragmenten enkelstrengs DNA aangebracht in zogeheten spots. Afhankelijk van het procédé passen op een chip van pakweg één bij één centimer 64.000 of meer spots van 200-300 micron groot.

Het aanbrengen van de spots kan op verschillende manieren gebeuren. Marktleider Affymetrix gebruikt een

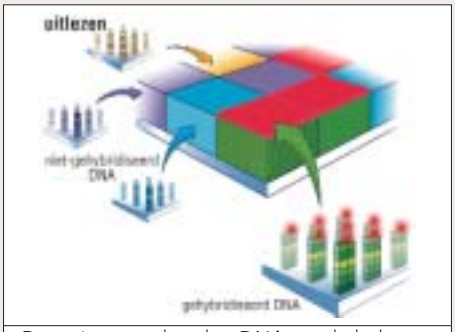
DNA-CHIPTECHNOLOGIE IN DRIE STAPPEN



Enkelstrengs DNA-fragmenten op de chip aanbrengen.

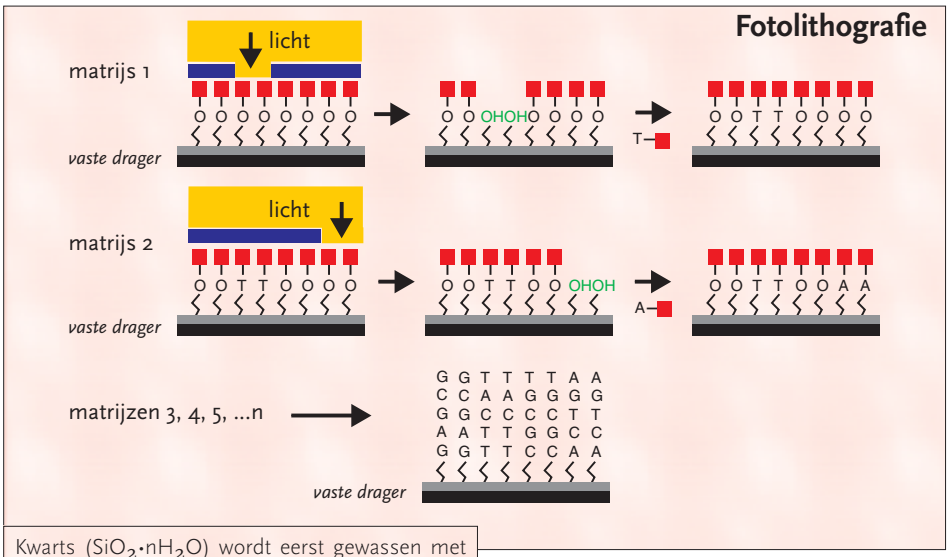


Koppeling van het gelabelde DNA uit het monster aan het DNA op de chip.



Detectie van gebonden DNA met behulp van een fluorescentiemeter.

Illustraties: Affymetrix



Bron: Danish Society for Biochemistry and Molecular Biology

Kwarts ($SiO_2 \cdot nH_2O$) wordt eerst gewassen met silaan (SiH_4) dat reageert met de hydroxylgroepen (OH). Hierbij ontstaat een dunne silaanfilm die zorgt voor een uniforme dichtheid van de OH-groepen over het oppervlak. Aan de OH-groepen worden vervolgens lichtgevoelige moleculen gekoppeld. Dan wordt het glas afgedekt met een matrijs die op specifieke plaatsen licht doorlaat. Bij belichting worden alleen die koppelmoleculen reactief, die het licht kunnen opvangen. Aan deze moleculen kan vervolgens één van de DNA-bouwstenen A, C, G of T worden gekoppeld. Door dit proces te herhalen met verschillende bouwstenen en verschillende matrijzen 'groeien' langzaam de DNA-strengen op het glas.

zogeheten fotolithografische techniek die is afgekeken van de manier waarop in de halfgeleider-industrie computerchips worden gemaakt (zie figuur 'fotolithografie'). Een tweede techniek voor het aanbrengen van spots is eveneens afkomstig uit de computerindustrie. Fabrikanten als Hewlett-Packard (HP) gebruiken daarvoor het principe van de inktjetprinters. De apparaten bevatten echter geen inktcasettes maar reservoirs met DNA en drukken af op glas of plastic in plaats van op papier. Het printen gaat in principe hetzelfde als bij klassieke inktjetprinters via een spuitmondje. En net zoals met een printer talloze verschillend gekleurde vlakken kunnen worden afdrukt door verschillende soorten inkt te gebruiken, kunnen met deze printtechniek talloze spots worden gemaakt door het reservoir telkens met andere DNA-fragmenten te vullen. Anders dan bij de lithografische techniek worden de DNA-strengen hierbij dus niet ter plekke opgebouwd op de chip, maar gaat het om kant-en-klare fragmenten die in één keer worden geprint.

VERKLIKKERS

Een DNA-chip is slechts de helft van het verhaal. De andere helft is het 'monster-DNA', afkomstig van een patiënt (of een plant, een bacterie, etc.). Nadat dit DNA is geïsoleerd wordt het meestal via de zogeheten *polymerase kettingreactie* (een techniek om kleine hoeveelheden DNA eindeloos te kopiëren) vermenigvuldigd om voldoende materiaal in handen te krijgen. Het wordt als enkelstrengs DNA op de chip geanalyseerd. Om later te kunnen waarnemen of het 'monster-DNA' bindt aan het 'chip-DNA' (hybridisatie) wordt het monster-DNA voorzien van een 'label' waaraan het herkenbaar is als het is gebonden. Zo'n label is bijna altijd een fluorescerende stof die licht uitstraalt als het DNA is gebonden. Deze fluorescerende verbindingen werken dus als verklikkers: ze maken duidelijk wáár precies de DNA-fragmenten hybridiseren op de chip.

HET ECHTE WERK

Het feitelijke experiment met de chips is vervolgens heel eenvoudig: door het gelabelde DNA in contact te brengen met de chip vindt vanzelf hybridisatie plaats. Tenminste, op de spots waarmee het DNA complementair is. De DNA-strengen op de chips fungeren als minuscule vliegenvangers, waaraan bepaalde DNA-fragmenten heel specifiek vastplakken. Nadat het niet-gehybridiseerde DNA is weggewassen kan men met een fluorescentiemeter achterhalen waar op de chip spots oplichten en hoe sterk die fluorescentie is. Dit levert specifieke patronen op die duidelijk maken welke DNA-fragmenten *matchen* en welke niet.

Eigenlijk begint pas dan het echte onderzoekswerk, namelijk het verwerken van alle data: wélk DNA-fragment is wáár gehybridiseerd? Op deze manier kan worden vastgesteld welke genen actief zijn, in de cellen waaruit het onderzochte DNA afkomstig is, of wat de volgorde is van het DNA in het monster. Dat is overigens makkelijker gezegd dan gedaan. Eén DNA-chip bevat immers vele tienduizenden spots en één enkel experiment levert dus vele tienduizenden meetresultaten op. Voor een mens is die informatieberg niet te behappen. Vandaar dat er supercomputers met speciale software worden gebruikt om de databrij te analyseren. Dit heeft een nieuwe tak van sport opgeleverd: de bioinformatica (zie p 6-7). Mede door de komst van DNA-chips lijkt biomedisch onderzoek hoe langer hoe meer een informatiewetenschap te worden, waarin een hoofdrol is weggelegd voor computers.

KOSTEN

DOE-HET-ZELF OF KANT-EN-KLAAR?

Omdat de eerste generaties commerciële DNA-chips bijzonder kostbaar waren – tot wel 1800 dollar per stuk – hebben veel grote onderzoeksinstellingen zélf de (print)apparatuur in huis gehaald om DNA-chips te maken. Soms gebeurde dit door een speciale faciliteit op te zetten, zoals bij de Universiteit van Amsterdam waar de β-faculteiten, het AMC en het rekencentrum SARA de handen ineen sloegen.

Zo'n 'doe-het-zelf' chip heeft alle voor- en nadelen van het doe-het-zelven thuis. Een voorbeeld: wie een boekenkast wil hebben kan die zelf ontwerpen en vervolgens materiaal kopen bij de Gamma. Het kost wat tijd, maar dan heb je wel een kast geheel naar eigen wens. Het alternatief is een *prefab* exemplaar van Ikea dat je alleen maar in elkaar hoeft te schroeven. Maar wat als je een tweede kast wilt hebben? Bij Ikea is die zó gehaald en krijg je bijna gegarandeerd een identiek exemplaar. Ga je weer zelf aan de slag dan is dat laatste nog maar de vraag.

Voor zelfgebouwde DNA-chips geldt exact hetzelfde: het duurt langer voor je ze in handen hebt en het blijkt in de praktijk vrij lastig om telkens identieke chips te maken. Met commerciële chips ben je weliswaar duurder uit, maar daarvan garandeert de fabrikant ook de kwaliteit en uniformiteit.

Sinds de commerciële chips driemaal zo goedkoop zijn geworden stappen steeds meer onderzoekers erop over. Vooral omdat de crux van wetenschappelijke studies blijft dat alle resultaten reproduceerbaar moeten zijn voor anderen ('Eén onderzoek is géén onderzoek', zo luidt een gevleugelde uitspraak onder wetenschappers). Het herhalen van onderzoek is met doe-het-zelf chips echter bijzonder moeilijk of soms zelfs onmogelijk.

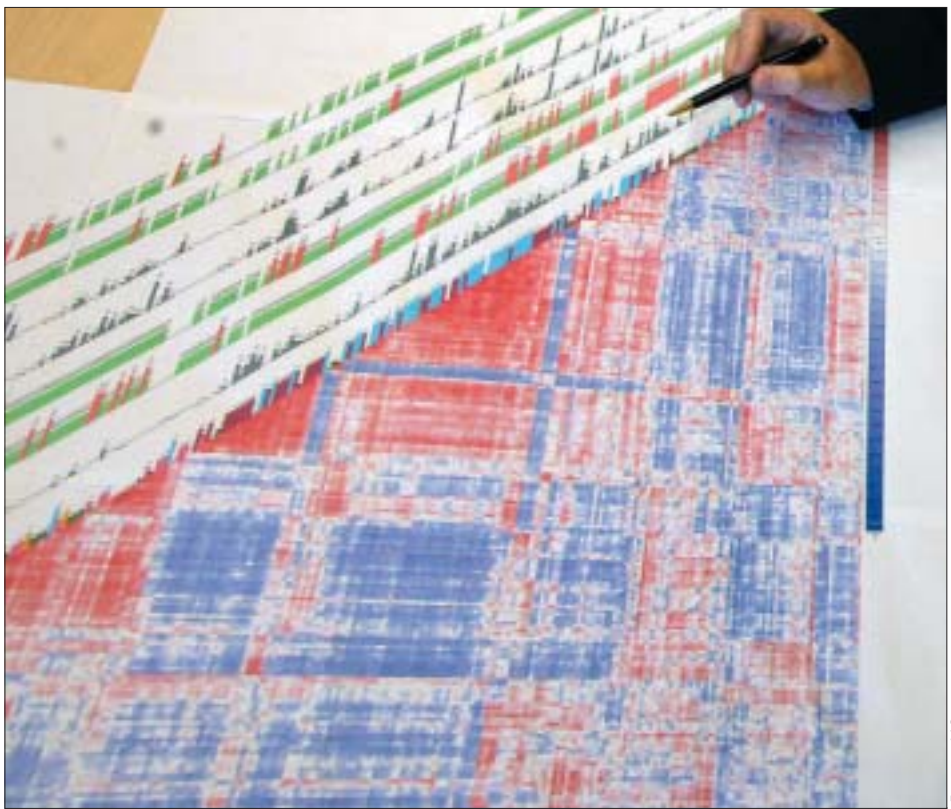
Het meten met een DNA-chip is één ding, maar het verwerken van het woud aan gegevens dat zo'n chip oplevert is een verhaal apart. Dankzij bioinformatica zien onderzoekers door de bomen toch nog het bos.

Een duik in de data

Vóór de komst van de DNA-chips waren studies aan het genoom vrij overzichtelijk. De meeste onderzoekers waren gepind op één enkel gen of één enkel eiwit en bovendien maakten de beschikbare technieken (zoals gel-elektroforese en blotten) het niet mogelijk om veel méér te bestuderen binnen een experiment. Dat is met de komst van DNA-chips wel veranderd. Op één enkele chip past immers het complete genoom van een mens, dier of plant en daardoor maakt de technologie het voor onderzoekers mogelijk naar vele duizenden genen tegelijk te kijken.

Grootste *bottleneck* hierbij is dat een meting met een chip zóveel data oplevert dat ze niet meer door een mens te verwerken zijn. De gegevens van een DNA-chip worden daarom rechtstreeks naar een computer gestuurd. Dit heeft geleid tot een rappe groei van de bioinformatica, de discipline die een vruchtbare symbiose vormt van computertechneuten en biowetenschappers. Een voorbeeld hiervan is de afdeling Bioinformatica van het Rotterdamse Erasmus MC, waar men niet alleen beschikt over een enorme batterij computers voor data-analyse maar ook over (medische) informatiespecialisten en programmeurs. De afdeling fungeert als een hightech servicecentrum dat samenwerkt met de onderzoeksafdelingen in het ziekenhuis, onder meer op het gebied van tumoren (bloed-, borst-, darm-, prostaat-, hersen- en longkanker) veroudering en hersenontwikkeling.

In de zomer van 2004 leidde zo'n samenwerking tot een publicatie in *The New England Journal of Medicine*. Het gaat over de genetische diagnostiek van beenmergkanker. Met behulp van DNA-chips bestudeerden Rotterdamse hematologen de activiteit van 13.000 (!) genen in tumorcellen van patiënten met acute myeloïde leukemie. Deze vorm van beenmergkanker kent verschillende verschijningsvormen, waarvan sommige te behandelen zijn en andere niet. Om de kans op genezing te vergroten moet het type van de tumor zo vroeg mogelijk worden bepaald. De klassieke diagnostische methoden leveren bij zestig procent van de patiënten geen duidelijke uitkomst op, maar met DNA-chips kunnen artsen liefst zestien verschillende typen beenmergkanker onderscheiden. Zo kan men het ziekteverloop beter voorspellen en de behandeling van individuele patiënten aanpassen.

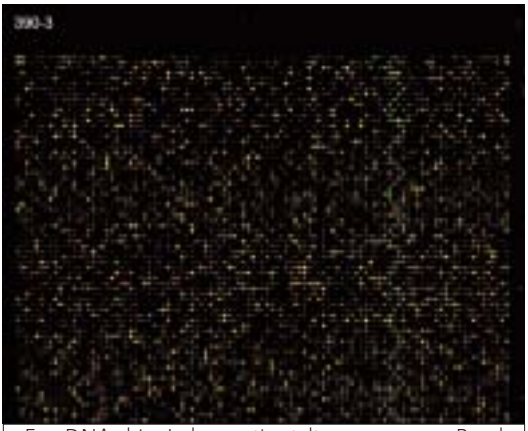


Erasmus MC

Computer genereert kruistabel die activiteitsverschillen tussen de verschillende genen toont. Rode stip staat voor gelijke activiteit en een blauwe stip betekent dat er geen grote verschillen zijn in activiteit in de onderzochte genen. Roze, wit en licht blauw staat voor de tussenliggende waarden.

TAFELKLEED

Bioinformatica speelde in deze studie een centrale rol. De Rotterdammers bepaalden bij bijna 300 patiënten welke van de 13.000 genen 'aan' en 'uit' stonden. Dat leverde een genetische streepjescode voor elke patiënt op. Met een speciaal computerprogramma vergeleken bioinformatici vervolgens de onderlinge verschillen tussen die streepjescodes: bij vele honderden genen analyseerde het programma in hoeverre de activiteit bij een patiënt afweek van de overige patiënten. Op basis hiervan genereerde de computer een zogeheten kruistabel waarin de activiteitsverschillen werden geplot. Met deze gigantische tabel – in de Rotterdamse wandelgangen ook wel 's werelds duurste tafelkleed genoemd – kunnen de verschil-



Een DNA-chip. Ieder spotje stelt een gen voor. Rood betekent hoge intensiteit van het fluorescentiesignaal, groen lage intensiteit en geel er tussen in. Hierdoor geeft de kleur aan hoeveel van het onderzochte DNA op die plek op de DNA-chip is gebonden. Hoe meer er gebonden is, hoe actiever het gen.

lende soorten beenmergkanker in één oogopslag worden onderscheiden.

GENPROFIEL

Het Nederlands Kanker Instituut (NKI) in Amsterdam ontwikkelde een DNA-chip waarmee met grote betrouwbaarheid voorspeld kan worden of borstkanker na het verwijderen van borst of tumor de komende jaren op andere plaatsen voor nieuwe tumoren zal zorgen.

De ontwikkeling van de chip startte met een zoektocht naar genen in borsttumorcellen die over- of juist onderexpressie vertoonden. Het expressieprofiel van bijna honderd borstkankerpatiënten met een bekend ziekteverloop werd onderzocht met een chip waarop 25.000 menselijke genen waren aangebracht. Deze genen werden vergeleken met het DNA van een gemiddelde borsttumorcel. De kleur en hoeveelheid licht (fluorescentie) laten het expressiegedrag van het tumorweefsel zien. Uit het onderzoek bleek dat de expressie van zo'n 5.000 genen in de tumorcellen gewijzigd is, waarvan er weer zeventig relevant blijken voor het ziekteverloop.

Voor de zeventig genen is een nieuwe chip ontworpen, waarmee het tumorweefsel van een grotere groep patiënten (ca. 300) werd onderzocht. Met behulp van algoritmen kunnen de expressiepatronen worden opgedeeld in twee klassen: één met een slechte prognose (kans op uitzaaiingen binnen tien jaar ca. 50 procent) en één met een zeer goede prognose (kans op uitzaaiingen binnen tien jaar, ca. 15 procent). Deze voorspelling overtreft in betrouwbaarheid de tot nu toe gebruikte parameters ruimschoots. |

TECHNISCHE ONTWIKKELINGEN

REAL-TIME METINGEN

Ondanks het grote succes van DNA-chips staan onderzoekers eigenlijk al te springen om een opvolger: een technologie die *real-time* DNA-analyses mogelijk maakt. Met de huidige generatie chips is dat helaas onmogelijk. Daarmee meet je immers alleen óf er hybridisatie van je monster plaatsvindt, maar niet hoe snel dat gebeurt.

Een groot struikelblok blijft daarnaast dat alle monsters op dit moment eerst gelabeld moeten worden met een fluorescerende stof – anders licht de chip immers niet op en zou niet te achterhalen zijn waar wel of geen hybridisatie heeft plaatsgevonden. Het labelen kost extra tijd en maakt het procédé ingewikkelder doordat er meerdere (was)stappen nodig zijn.

Een oplossing voor deze problemen zou een compleet andere aanpak zijn, bijvoorbeeld gebaseerd op optische vezels die aan het uiteinde zijn gecoat met enkelstrengs DNA-fragmenten. Wanneer daar ongelabeld RNA of DNA mee hybridiseert zou je dit in 'real time' kunnen meten door de verandering te bepalen van de elektrische weerstand van de vezel. Op dit moment is een dergelijke techniek helaas nog niet voorhanden, maar insiders zijn ervan overtuigd dat er een nieuwe technologische doorbraak zal komen. De vraag is alleen nog wanneer dat gebeurt.

DRIEDIMENSIONALE CHIPS

DNA-chips lijken voorlopig nog niet uitontwikkeld. Zo heeft het Bossche bedrijf PamGene in 2002 een speciale driedimensionale *PamChip* ontwikkeld. De truc van deze *poly analyte measurement* chip is dat er geen glas als drager wordt gebruikt maar poreus keramiek met aluminiumoxide. Dit dragermateriaal bevat duizenden capillairen – zeer dunne kanaaltjes van enkele millimeters lang – die met DNA worden gecoat. Voordeel hiervan is dat het reactieoppervlak van de chip vele malen groter is dan bij klassieke DNA-chips. Bovendien kunnen monsters door de capillairen worden gepompt, waardoor de hybridisatie van het DNA op de chip aanzienlijk sneller verloopt. Een meting met zo'n chip duurt enkele minuten in plaats van vele uren.

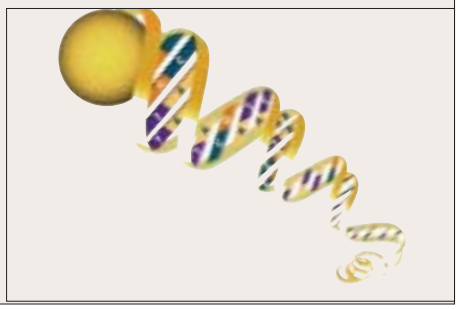
Inmiddels heeft het bedrijf samen met het Koninklijk Instituut voor de Tropen een PamChip ontworpen voor het opsporen van de tuberculosebacterie en andere mycobacteriën. En samen met Plant Research International (een onderdeel van Wageningen Universiteit & Researchcentrum) is een variant van de chip ontwikkeld waarmee monsters van planten snel gescreend kunnen worden op verschillende schimmels, bacteriën en virussen. Zo'n chip kan van grote waarde zijn als controle-instrument bij de export van gewassen of als diagnostische tool om in een vroeg stadium ziekteverwekkers op te sporen die de oogst kunnen aantasten.

EIWIT-CHIPS

Een heilige graal voor onderzoekers zijn eiwitchips. Uiteindelijk blijven het immers de eiwitten die alle processen in organismen regelen – of anders gezegd: lopen processen in het honderd doordat eiwitten slecht of zelfs helemaal niet functioneren. DNA vormt weliswaar de blauwdruk voor eiwitten, maar het probleem is dat je niet alles wat op DNA-niveau gebeurt zonder meer terugziet op eiwit-niveau. Om dit te ondervangen ligt rechtstreeks meten aan eiwitten voor de hand.

In theorie lijkt dat wel te doen. Je zou circa een miljoen antilichamen moeten maken die alle eiwitten van een bepaald organisme herkennen en deze antilichamen vervolgens moeten coaten op een chip. Daarop breng je het monster aan waarin de eiwitten zijn gelabeld met een fluorescerende kleurstof. Normale eiwitten zullen binden aan de chip, maar afwijkende eiwitten niet. Die kleuring maak je zichtbaar in een fluorescentiemeter, je laat vervolgens de bioinformatica erop los – *et voilá*!

Helaas is de praktijk anders. Eiwitten zijn chemisch gezien oneindig veel complexer dan DNA en het maken van alle benodigde monoclonale antilichamen zou veel tijd in beslag nemen. Er bestaan overigens wel al eiwit-chips voor specifieke toepassingen: het Duitse Schleicher & Schuell maakt bijvoorbeeld zogeheten *antibody-arrays* waarmee tumoreiwitten in serum van kankerpatiënten opgespoord kunnen worden en het Amerikaanse bedrijf Ciphergen heeft een *protein-chip* voor de diagnostiek van prostaatkanker. Maar een chip waar het complete menselijke 'proteoom' op past blijft voorlopig nog ver buiten handbereik. |



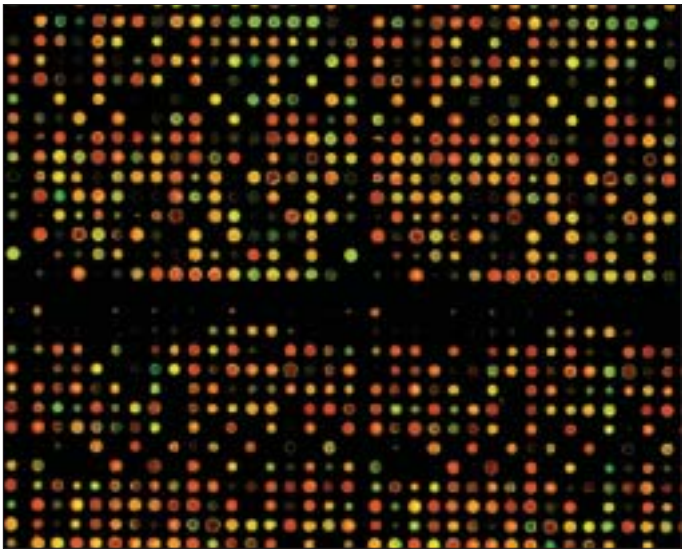
Meer weten

AANBEVOLEN LITERATUUR

- 'Chipping Forecast', Nature Genetics, supplement vol 21 (1999), 1-60.
- 'Chipping Forecast II', Nature Genetics, supplement vol 32 (2002), 461-552.
- 'The making of a Microarray', Peter Gwynne & Gary Heebner, Science, vol 295 (jan 2002).
- 'Microarrays on the Move', Peter Gwynne & Gary Heebner, Science, vol 303 (feb 2004).
- 'The Magic of Microarrays', Stephen H. Friend & Roland B. Stoughton, Scientific American, vol. 286 (feb 2002), 44-50.

AANBEVOLEN WEBSITES

- www.gene-chips.com: portal-site met tips en links naar andere sites over DNA-chips.
- www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chip/chip.html: site met een interactieve Flash-animatie die de werking van DNA-chips mooi visualiseert.
- www.genomics.nl: officiële site van het Nationaal Regie-Orgaan genomics, met beschrijvingen van alle deelnemende instellingen.
- www.ncbi.nlm.nih.gov: homepage van het Amerikaanse National Center for Biotechnology Information, vooral gericht op genoom-onderzoekers en bio-informatici.
- www.affymetrix.com: site van de Amerikaanse marktleider Affymetrix, met veel info en foto's over DNA-chips.
- www.plant.wageningen-ur.nl: site van Plant Research International in Wageningen, waar onderzoek plaatsvindt naar het gebruik van DNA-chiptechnologie bij planten en gewassen.
- www.pamgene.com: site van PamGene, het bedrijf achter de PamChips.
- www.cmbi.nl: site van het Nijmeegse Centre for Molecular en Biomolecular Informatics, één van de belangrijkste Nederlandse centra voor bio-informatica.



VOOR OP SCHOOL

1. Beschrijf de bouw van chromosomen en genen voor iemand die een leek is op het gebied van moleculaire genetica.
2. Wat wordt bedoeld met het genetische alfabet?
3. Noem drie overeenkomsten en verschillen tussen een DNA-chip en een computerchip.
4. Je hebt een reageerbuis met kankercellen en een doosje met DNA-chips. Wat is je aanpak om te bepalen welke genen actief zijn (op 'aan' staan) in de kankercellen?
5. Beschrijf twee technieken om een DNA-chip te maken. Wat zijn verschillen en overeenkomsten?
6. Wat is het chemische principe van de DNA-chip technologie? Waardoor is A complementair met T en past C enkel bij G?
7. Elk te meten DNA-fragment wordt voorzien van een fluorescerende marker. Waardoor licht deze marker op?
8. Welke rol speelt de DNA-chip bij preventie van kanker?
9. Met DNA-chip technologie kan de houdbaarheid van snijbloemen voorspeld worden. Geef argumenten voor en tegen dit kostbaar en arbeidsintensief onderzoek.
10. Waarom zou je eigenlijk liever een eiwitchips hebben en waarom is het zo moeilijk om die te maken?

COLOFON

Chemische Feitelijkheden: actuele encyclopedie over moleculen, mensen, materialen en milieu. Losbladige uitgave van de KNCV, verschijnt drie maal per jaar met in totaal tien onderwerpen.

Redactiesamenstelling:
Lisette Ploeg (KNCV)
Alexander Duyndam (C2W)
Marian van Opstal (Bèta Communicaties)

Basisontwerp: Menno Landstra

Redactie en realisatie:
Bèta Communicaties
Postbus 84098, 2508 AB Den Haag
tel. 070-306 07 26
fax 070-306 07 24
betacom@planet.nl

Uitgever:
Roeland Dobbelaer
Bèta Publishers
Postbus 249, 2260 AE Leidschendam
tel. 070-444 06 00
fax 070-337 87 99
info@betapublishers.nl

Abonnementen opgeven:
KNCV-ledenadministratie
Postbus 249, 2260 AE Leidschendam
tel. 070-337 87 97
fax 070-337 87 99
ledenadministratie@kncv.nl

Abonnementen kunnen elk moment ingaan. Abonnementen worden automatisch verlengd tenzij vóór 1 november van het lopende jaar een schriftelijke opzegging is ontvangen.

Abonnementen:
• papieren editie en toegang tot digitaal archief op internet
eerste jaar
(inclusief verzamelmap): € 90,-
KNCV- en KVCV-leden: € 80,-
tweede jaar en verder: € 56,-
KNCV- en KVCV-leden: € 46,-

• alleen toegang tot digitaal archief op internet
eerste jaar: € 70,-
KNCV en KVCV-leden: € 60,-
tweede jaar en verder: € 45,-
KNCV en KVCV-leden: € 40,-

DNA-CHIPS

editie 46
nummer 214
februari 2005

Met dank aan:
- prof.dr. Peter van der Spek
  afd. Bio-Informatica Erasmus MC, Rotterdam
  p.vanderspek@erasmusmc.nl
- dr. Anton Horrevoets
  afd. Biochemie AMC, Amsterdam,
  a.j.horrevoets@amc.uva.nl
- Erik Toussaint
  Plant Research International, Wageningen
  erik.toussaint@wur.nl
- drs. Gerard Stout
  docent exacte vakken
  Noordelijke Hogeschool Leeuwarden
  g.h.w.j.stout@iec.nhl.nl