

Genen of geen genen

Amper één procent van ons DNA 'doet' ook echt iets in ons lichaam. De rest is rommel, of junk-DNA. Of toch niet? Wetenschappers ontdekken steeds meer waardevols in deze genetische woestijn.

Door Tim VERNIMMEN

Viel dat even tegen, toen genetici bij het afsluiten van het Human Genome Project in 2003 bekend maakten hoeveel genen wij mensen hebben: een goede twintigduizend, ochtarne. Nauwelijks meer dan de onbenullige fruitvliegjes die in de keuken opduiken als u het groente- en fruitafval vergeet buiten te zetten. Slechts twintigduizend lettercombinaties in de drie miljard letters tellende genetische uiteenzetting in ons DNA – één luttele procent – bleken ook echt te coderen voor één van de eiwitten die in onze cellen het merendeel van het werk verrichten. Dat was slikken: vereisten onze atletische lijven, onze vaardige handen en onze duizelingwekkende intelligentie dan echt geen complexere genetische infrastructuur dan die van het eerste het beste insect – of erger nog, de rijstplant, die dubbel zoveel genen heeft?

Met het van A tot T uitgespelde genoom in de hand gingen wetenschappers op zoek naar de onderlinge verschillen tussen mensen – en dan vooral naar weerkerende 'tikfouten' of SNP's ('Single Nucleotide Polymorphisms'), verschillen van één letter, die ze probeerden te linken aan bepaalde aandoeningen. Heel af en toe vonden ze een gen dat overduidelijk van belang was, zoals het ApoE-gen, dat een rol speelt in het vetmetabolisme en de levensverwachting beïnvloedt (zie 'De helaasheid der rimpels' in *Eos* nr. 4, 2011). Veel vaker echter – in bijna negen gevallen op de tien – bleek de SNP (spreek uit: 'snip') zich helemaal niet ter hoogte van een gen te bevinden, maar ergens plompverloren in het ogenschijnlijk waarde-loze junk-DNA.

Een ambitieuze groep wetenschappers, die zou uitgroeien tot een menigte van bijna 450, startte niet veel later met het ENCODE-project, wat staat voor 'ENCyclopedia Of DNA Elements'. Bedoeling was om nauwgezet te gaan graven in onze genetische woestijn. Bijna tien jaar en

minstens 150 miljoen euro later presenteerden ze in september vorig jaar hun resultaten, aan de hand van meer dan dertig wetenschappelijke artikels. Daaruit blijkt dat maar liefst tachtig procent van het DNA een actieve rol speelt in onze cellen – waarmee de term junk-DNA in de vuilnisbak verdween.

EINDELOOS AANTAL BOCHTEN

Welke delen van het DNA wanneer actief zijn, ontdekten de onderzoekers via een omweg. In elk van onze cellen zitten 46 chromosomen (behalve in de voortplantingscellen, die hebben er maar de helft), afzonderlijke DNA-moleculen die allemaal samen goed zijn voor maar liefst twee meter DNA per celkern. Aangezien die kern een gemiddelde diameter heeft van slechts 5 à 10 micrometer (dat is ongeveer een tiende van de dikte van de pagina waarop deze tekst gedrukt staat), moeten de moleculen zich in een bijna eindeloos aantal bochten wringen om in de kern te passen. Dat gebeurt onder meer met behulp van de histonen, schijfvormige eiwitten waarrond het DNA is opgerold. Wanneer de cel dat DNA nodig heeft, gewoon-

Daarvan hebben de wetenschappers handig gebruikgemaakt. Het enzym DNase I, dat gewoonlijk instaat voor het opruimen van beschadigd DNA, speelt waarschijnlijk een sleutelrol bij het elimineren van zieke of overbodig geworden cellen. Hoe meer DNase er circuleert, hoe groter de kans dat ook intact DNA wordt verwijderd. Dat was precies waar de onderzoekers op mikten door aan de 125 celtypes die ze onderzochten een overdosis DNase I toe te dienen. Actief DNA, zo wisten ze uit ervaring, is niet alleen beter toegankelijk voor de eiwitten die een rol spelen bij het overschrijven ervan, maar ook voor DNase. Plaatsen in het DNA die telkens weer beschadigd raakten, waren dus vermoedelijk actief in de onderzochte cel.

Deze aanpak resulteerde in een lange lijst van toegankelijke, en dus actieve, regio's in het DNA: zo'n 200.000 per cel, of bijna drie miljoen in totaal. Pakweg drie procent daarvan, vermoeden de onderzoekers, zijn zogenoemde promotors. Dat zijn de DNA-sequenties die aan onze genen voorafgaan en in samenwerking met regulerende eiwitten bepalen in welke mate de genen worden overgeschreven

Enhancers zorgen ervoor dat er precies op het juiste moment en op de juiste plaats eiwitten worden aangemaakt

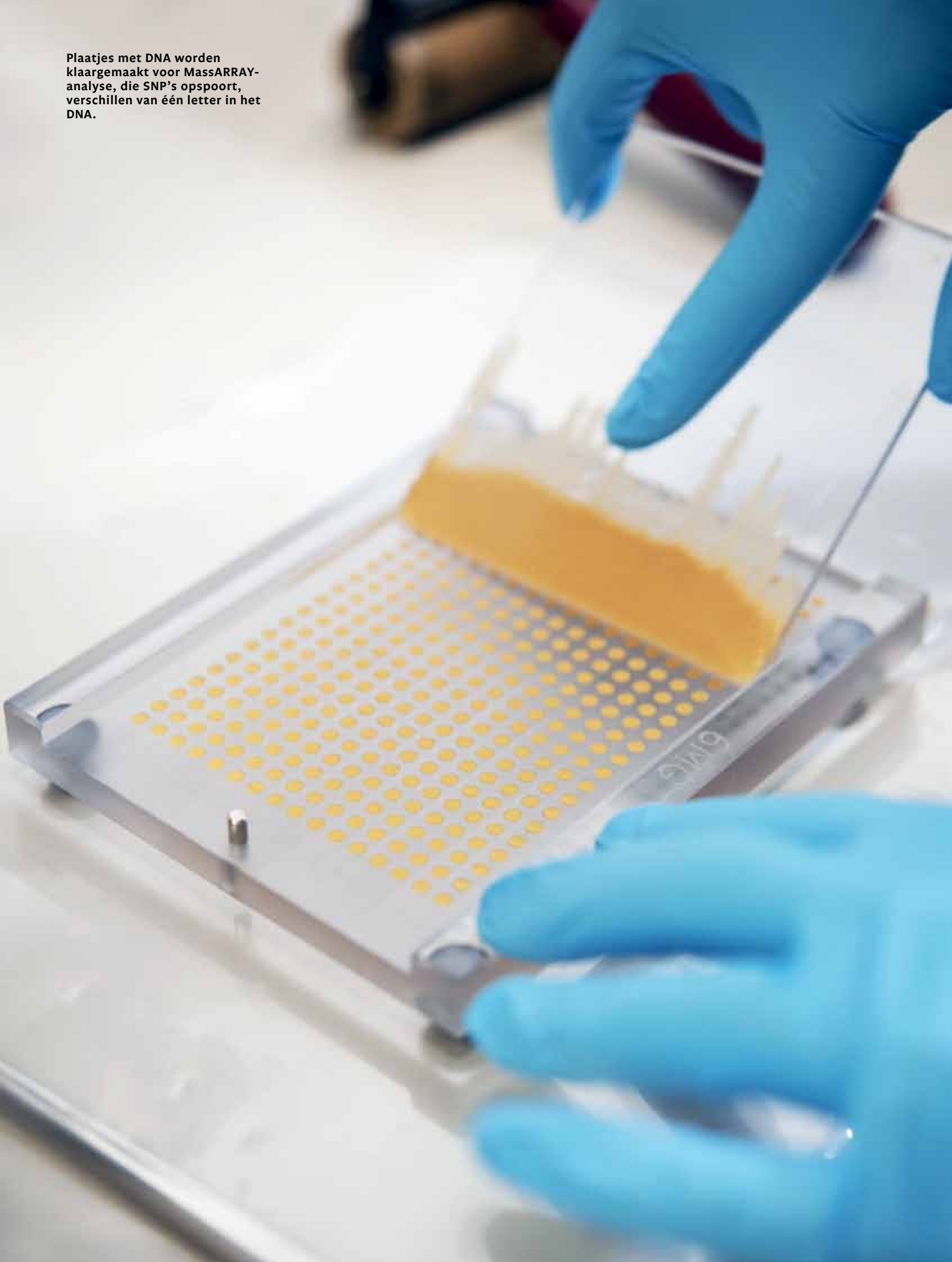
lijk om het over te schrijven op boodschapper-RNA-moleculen die buiten de celkern de bouw van nieuwe eiwitten in goede banen leiden, zitten die histonen lelijk in de weg. Actief DNA wordt dan ook gekenmerkt doordat het wat minder dicht opeengepakt zit – de histonen worden tijdelijk uit de weg gerold, of ondergaan chemische aanpassingen waardoor het DNA toegankelijker wordt.

naar boodschapper-RNA. Promotors zijn te herkennen aan enkele specifieke chemische aanpassingen aan de nabijgelegen histonen, die ervoor zorgen dat het DNA eromheen wat losser gaat zitten.

REGULATIE OP LANGE AFSTAND

Maar dan blijven er dus nog vele honderduizenden actieve onderdelen over die zich

Plaatjes met DNA worden klaargemaakt voor MassARRAY-analyse, die SNP's opspoor, verschillen van één letter in het DNA.



niet in de buurt van een gen bevinden, maar in uitgestrekte 'genwoestijnen'. Wat doen die daar?

Om dat uit te zoeken onderwierpen de onderzoekers de resultaten van de DNase I-behandeling aan een grondige statistische analyse. Ruim een half miljoen verafgelegen sequenties bleken telkens actief wanneer een

bepaalde promotor ook aan het werk was. Dat doet vermoeden dat ze zelf op de één of andere manier inwerken op die promotor om het overschrijven van het daaropvolgende gen - en zo de productie van het bijbehorende eiwit - naar hun hand te zetten. Wetenschappers doopten deze sequenties 'enhancers'. Dat wordt soms vertaald als 'versterkers', maar dat

is niet helemaal juist. Het Engelse 'to enhance' betekent namelijk ook 'verbeteren', en dat is exact wat de enhancers doen: ze zetten de puntjes op de i bij de overschrijving van genen naar boodschapper-RNA, en zorgen er zo voor dat er precies genoeg eiwitten worden aangemaakt op precies het juiste moment en op de juiste plaats.

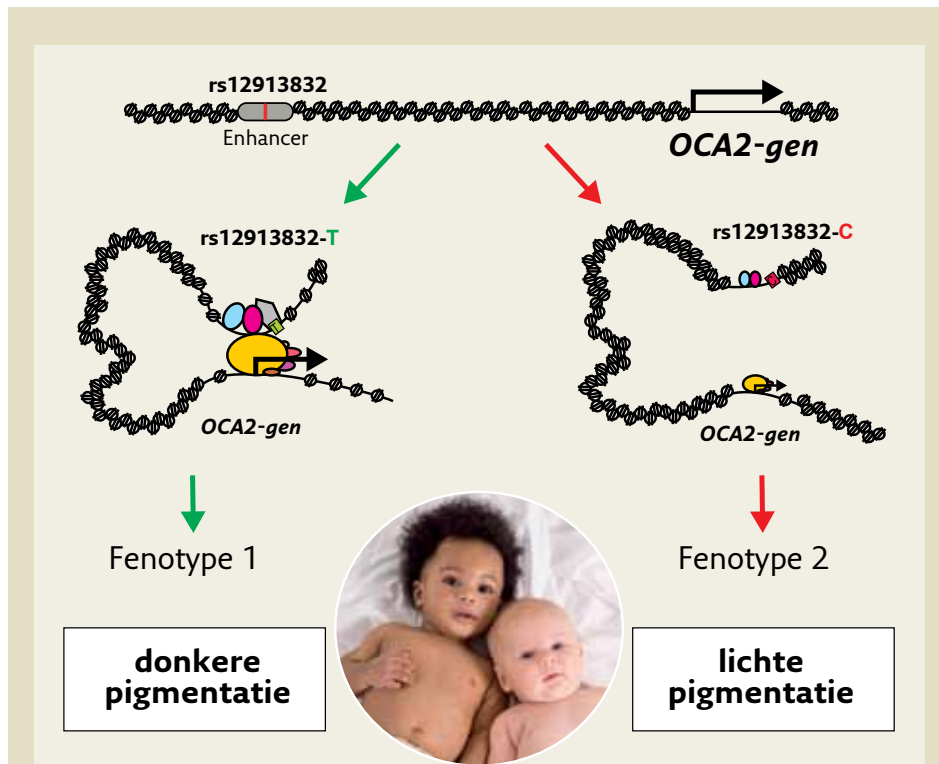
Hoe dat in zijn werk gaat, is al enkele decennia onderwerp van grensverleggend Nederlands onderzoek. Dat begon begin jaren 1980 met een opmerkelijke patiënt, die leed aan β -thalassemie, een aandoening die veroorzaakt wordt door de verminderde productie van β -globines in de rode bloedcellen. Die bolvormige eiwitten vormen één van de belangrijkste bouwstenen van hemoglobine, het eiwitcomplex dat instaat voor het transport van zuurstof en koolstofdioxide in ons lichaam. Door het tekort aan β -globines hapert het rijpingsproces van de rode bloedcellen, wat kan leiden tot bloedarmoede. Verrassend genoeg, ontdekte moleculair bioloog Frank Grosveld (Erasmusuniversiteit Rotterdam), bleek bij deze patiënt, die een deel van het elfde chromosoom miste, het β -globine-gen intact. Experimenten wezen echter uit dat het slecht toegankelijk en dus zelden actief was - behandeling met DNase had bijvoorbeeld weinig of geen effect.

Bij gezonde rode bloedcellen was dat anders, en bovendien vertoonden die ook activiteit in het deel van het chromosoom dat bij de patiënt ontbrak. Daaruit bleek onomstotelijk dat de activiteit van een verderop gelegen stuk DNA belangrijk was voor het functioneren van het β -globine-gen. Grosveld doopte dat stuk LCR (voor *Locus Control Region*) en groeide uit tot een autoriteit op het vlak van de genregulatie op lange afstand. Er bleef echter discussie over het mechanisme - liet de enhancer echt van op afstand zijn invloed gelden, of was daarvoor contact met het gen vereist?

Twintig jaar later zorgde alweer een Nederlander voor een nieuwe doorbraak. Biochemicus Job Dekker, vandaag hoogleraar aan de Universiteit van Massachusetts, slaagde erin de interactie tussen twee willekeurige delen van een chromosoom in kaart te brengen. Dat liet niet alleen toe om na te gaan welke regio's geregeld in elkaars buurt vertoefden, zo legde hij uit, maar ook om de 3D-structuur van het chromosoom te reconstrueren. Hij gebruikte daarvoor een techniek die hij Chromosome Conformation Capture (of 3C) doopte.

BEKEERD BINDWEEFSEL

Erg interessant, vond Grosveld, en dus toog hij samen met zijn collega Wouter De Laat aan het werk om te zien wat de techniek hen kon bijleren over de rode bloedcel. De 3C-techniek is gebaseerd op het gebruik van formaldehyde, een



Huidkanker

Robert-Jan Palstra (Erasmus Universiteit Rotterdam) toonde onlangs aan dat een van de talloze hopeloos verdwaalde SNP's, foutjes in het DNA, in de databases van teleurgestelde genetici deel uitmaakt van een enhancer, die de aanmaak van eiwitten beïnvloedt. 'Dat was tot nog toe enkel aangetoond voor zeldzame genetische defecten', vertelt hij enthousiast. 'Maar nog nooit voor een prima functionerende enhancer met zo'n grote impact.' Die SNP, met de onvergetelijke naam rs12913832, ligt verborgen in een intron van een ander gen, dat is een stuk van het gen dat wel naar het boodschapper-RNA wordt overgeschreven, maar vervolgens wordt weggeknipt. Omdat het toch niet belangrijk is voor de aanmaak van eiwitten, is er in zo'n intron ruimte voor een enhancer. 'Uit genetische studies weten we dat deze SNP sterk geassocieerd is met pigmentatie', aldus Palstra. 'Mensen die op die plek een T hebben (de base thymidine, groene pijlen links), zijn doorgaans donkerder dan mensen met een C (de base cytidine, rode pijlen rechts). Allereerst stelden de wetenschappers vast dat het DNA rondom

de SNP enkel actief was in melanocyten, dat zijn de cellen die instaan voor de aanmaak van pigment. Dat bleek bovendien meer het geval in de cellen afkomstig van een donor met een donkere huidskleur.

Experimenten met de enhancer in het lab toonden vervolgens aan dat de enhancer de activiteit van de genen in zijn omgeving wel degelijk aanzienlijk doet toenemen, vooral bij de donor met de donkerste huid. Tot slot gingen de onderzoekers na met welk gen de enhancer in de melanocyten zelf toenadering zocht. 'Dat bleek, zoals verwacht, het OCA2-gen te zijn, een gen waarvan we weten dat het betrokken is bij de pigmentatie, omdat het vaak defect blijkt bij mensen met albinisme.'

De lijst met kandidaat-SNP's voor nieuw onderzoek is lang, maar Palstra heeft voor de toekomst vooral de enhancers in het vizier die betrokken zijn bij allerlei huidkankers. 'Als we beter begrijpen hoe zo'n enhancer precies te werk gaat, levert dat hopelijk ook nieuwe inzichten op over de betekenis van genetische variatie bij mensen, en hun aanleg voor aandoeningen als kanker.'

vloeistof waar in het verleden vaak dode dieren in bewaard werden. 'Als we formaldehyde toevoegen aan de celkern, gaan de eiwitten op het DNA samenklonteren', legt De Laat uit, 'waardoor delen van het DNA die zich in elkaars nabijheid bevinden aan elkaar geklonken worden, en de 3D-structuur bewaard blijft.' Met behulp van restrictie-enzymen wordt het DNA vervolgens in stukken geknipt. Het resultaat van die behandeling zijn kleine eiwitpropjes met flarden DNA die in de kern dicht bij elkaar lagen. 'Zo kunnen we zien welke fragmenten zich vaak in elkaars buurt ophouden, en dus mogelijk met elkaar in contact staan', aldus De Laat. 'Dat leverde in onze rode bloedcellen meteen erg interessante resultaten op.' De LCR, die zich niet alleen over het β -globine-gen ontfermt, maar ook over nabijgelegen genen die coderen voor enkele andere globines, bleek zich wel degelijk dicht tegen die genen aan te vlijen. 'Het DNA tussen het genlocus waar de globinegenen zich bevinden en de LCR vormt vermoedelijk een lus', legt De Laat uit, 'waardoor de enhancer en de genen die hij controleert vlak bij elkaar komen te liggen.' Dat gebeurt alleen in rode bloedcellen, en enkel op het moment dat de specifieke globines nodig zijn: het eerste gen wordt actief tijdens het embryonale stadium, de volgende twee in de zich ontwikkelende foetus, en de laatste twee bij volwassenen. 'Uit dit eenvoudige voorbeeld blijkt duidelijk dat zo'n enhancer een erg handig werktuig is', aldus De Laat, 'heel flexibel, maar uiterst precies, zowel in tijd als ruimte.' Omdat enhancers vele verschillende regulerende eiwitten kunnen binden, en er vervolgens verschillende enhancers op hetzelfde gen kunnen inwerken, wordt het mogelijk om in verschillende cellen met precies dezelfde genen heel verschillende dingen te doen. Zo toonden wetenschappers enkele jaren gele-

Wij hebben uitgestrektere genloze regio's dan pakweg fruitvliegen. Ze bieden ruimte aan regulerende krachten

den aan dat het toedienen van een handvol transcriptiefactoren volstaat om er bindweefselcellen uit de huid mee in stamcellen te veranderen. Uit de resultaten van het ENCODE-project blijkt dat de betreffende eiwitten steevast ter hoogte van bepaalde enhancers elkaars gezelschap opzoeken - en vermoedelijk van daaruit het overschrijven van de genen zodanig beïnvloeden dat een bindweefselcel in een veelzijdige stamcel verandert. Daarmee bewerkstelligden ze eigenlijk het tegenovergestelde van wat transcriptiefactoren



Chromosoom 14 bestaat uit 886 genen en een grote hoeveelheid junk-DNA. Analyse wees uit dat op chromosoom 14 genen te vinden zijn die gelinkt zijn met alzheimer.

en enhancers gewoonlijk doen, namelijk het begeleiden van de stapsgewijze specialisatie van cellen die zich nog niet tot een bepaald weefsel- of celttype bekeerd hadden.

VEILIG EXPERIMENTEREN

Terwijl de genen die instaan voor de vorming van beta-globine enkel actief zijn in de rode bloedcellen, zijn de genen die coderen voor de transcriptiefactoren die de embryonale ontwikkeling aansturen in grote delen van het lichaam actief. Samen met de Zwitserse ont-

niek, 4C, die toelaat om alle interacties van een bepaalde plek in het DNA in één keer in beeld te brengen, ontdekten Duboule en De Laat dat de actieve genen zich groeperen, zodat de eiwitten die instaan voor het kopiëren van genetische informatie naar boodschapper-RNA zich daarvoor niet voortdurend moeten verplaatsen. Daarmee geeft het onderzoek eindelijk het begin van een antwoord op de vraag wat ons DNA eigenlijk de hele dag dóet in de celkern. Ook fruitvliegen hebben enhancers, zo leren we op de conferentie. Toch is er een belangrijk verschil, denkt Duboule: 'Fruitvliegen mogen dan wel een vergelijkbaar aantal genen hebben als wij, die liggen veel dichter bij elkaar. De gendichtheid in ons DNA is maar een tiende daarvan. Aanvankelijk vonden we dat natuurlijk vreemd, omdat iedereen dacht dat die genwoestijnen nergens voor dienden. Maar nu weten we dus dat die uitgestrekte genloze regio's speelruimte bieden aan enhancers en andere regulerende elementen, en daar hebben we er veel meer van dan eenvoudigere levensvormen als de fruitvlieg. Mogelijk maakt dat dus het verschil, eerder dan het aantal genen.' En dat heeft zo zijn voordelen, denkt celbioloog Robert-Jan Palstra van de Rotterdamse Erasmusuniversiteit. 'Het lijkt me veel veiliger om in de loop van de evolutie wat met enhancers te experimenteren dan met de genen zelf. Gaat het mis, dan moet je misschien een enhancer elimineren, maar dan is het gen toch nog intact.' ■