

DNA-onderzoek in een stroomversnelling

Jan van Kan &
Like Fokkens

Wageningen University
jan.vankan@wur.nl
like.fokkens@wur.nl

Analyse van DNA-sequenties is een belangrijke pijler in plant-pathogeen onderzoek. Het zal niemand ontgaan zijn dat dit type analyse in de laatste dertig jaar een vlucht heeft genomen. In dit artikel komen twee generaties onderzoekers aan het woord, die allebei werken aan ziekteverwekkende schimmels. Rond 1990 begon Jan van Kan met het sequencen van individuele schimmel genen. Dat ging nog grotendeels handmatig en het voornaamste doel was het ontrafelen van de functie van het eiwit waarvoor het gen codeert. Binnen vijftien jaar werden individuele gensequenties hele genomesequenties. Like Fokkens vergeleek in haar promotieonderzoek meer dan veertig hele genomen van planten, dieren en schimmels. Inmiddels zijn we van het sequencen van individuen naar het sequencen van populaties en microbiële gemeenschappen gegaan. Wat betekenen al die nieuwe ontwikkelingen voor plantenziektkundig onderzoek?

Jan van Kan

“De biologische complexiteit van plant-pathogeen interacties is moeilijk te bevatten door één persoon. Het vereist teamwerk om echte vooruitgang te boeken.”

Waar komen we vandaan?

Jan van Kan

“Het onderzoek begon rond 1990 en richtte zich op moleculaire analyse van eiwitten en genen van pathogene schimmels, om hun rol te bestuderen in het infectieproces en in de inductie van resistentiereacties



Jan van Kan en Like Fokkens: “De technieken voor DNA-sequencing zijn in 30 jaar tijd veel veranderd en deze nieuwe ontwikkelingen hebben groot effect op het plantenziektkundig onderzoek.”

in de waardplant. In deze periode waren genomesequenties nog niet beschikbaar, en moesten de studies voor elk gen apart worden opgezet. Om een enkel gen in handen te krijgen en de sequentie te bepalen was je al gauw 6-12 maanden bezig. Om vervolgens de functie van dit gen te bestuderen moesten er mutanten van de schimmel worden gemaakt, en die techniek moest vanaf de grond worden opgezet. De proeven werden meestal uitgevoerd met één stam van één schimmelsoort, en er was weinig zicht op andere stammen en soorten. Het beschrijven van de sequentie van een enkel gen, de expressie tijdens infectie op een waardplant, en de rol in het infectieproces was garantie voor een mooie publicatie.”

“Technisch gezien zijn er enorme stappen gezet in schaalvergroting en optimalisatie van experimentele methodes, en de verwerking van informatie. In de jaren '90 was moleculair-genetisch onderzoek echt handwerk dat -met alles dat technisch mis kon gaan- ervaring vereiste. Het gebruik van commerciële kits voor DNA-, RNA- of eiwitisolatie maakte het onderzoek gemakkelijker, meer ‘fool-proof’, maar ook duurder. Kloneren (een kopie van een gen maken), sequencen, schimmels en planten transformeren, eiwitproductie in bacteriën, gisten, planten: alles werd sneller en efficiënter.

De beschikbaarheid van genomesequenties van planten en schimmels vanaf ongeveer 2005 heeft het onderzoek in een gigantische stroomversnelling gebracht. Eerst kwam die informatie soort voor soort binnen, maar inmiddels worden er populaties van honderden individuen per soort gesequenced en geanalyseerd. Het is fascinerend dat op dit moment de sequenties van alle genen en eiwitten al bekend zijn, en dat de onderzoeker ‘alleen maar’ hun functie en wisselwerking met andere genen of eiwitten tijdens het infectieproces hoeft te ontrafelen. De puzzelstukjes liggen allemaal op tafel, maar de puzzel leggen blijft een boeiend en tijdrovend proces. Door de enorme hoeveelheid data kan een onderzoek meerdere kanten op, daarbij is het moeilijk om de focus te behouden.”

Like Fokkens

“Al heel vroeg werden gensequenties uit verschillende soorten met elkaar vergeleken, dus niet alleen moleculair maar ook evolutionair onderzoek kwam van de grond. In het begin kwam dit vooral neer op het afleiden van de stamboom van verschillende soorten, maar later kwam daar ook onderzoek naar individuele genfamilies bij. Daarbij zag je interessante verschillen in dynamiek tussen genfamilies: sommige families zijn heel geconserveerd tussen soorten, en verzamelen

maar weinig mutaties, terwijl andere genen vaak verloren raken in individuele stammen, en veel mutaties verzamelen. Al in de jaren '70 werd gespeculeerd over de rol van genduplicatie, waarna elke kopie zich specialiseert of waarbij soms een kopie een nieuwe functie krijgt, en nu konden we dat proces onderzoeken en het belang ervan kwantificeren. De ontwikkelingen in DNA-sequencing zorgden er dus niet alleen voor dat we bijvoorbeeld genen die betrokken zijn bij infectie sneller en accurater kunnen identificeren, ze maakten ook mogelijk dat we nieuwe vragen kunnen stellen, bijvoorbeeld over hoe schimmels en planten zich aan elkaar aanpassen.

Like Fokkens

“De ontwikkelingen in DNA-sequencing maakten mogelijk dat we nieuwe vragen kunnen stellen, bijvoorbeeld over hoe schimmels en planten zich aan elkaar aanpassen.”

Waar we vroeger vooral vergeleken tussen soorten, kijken we nu meestal naar verschillen binnen een soort, bijvoorbeeld tussen stammen die verschillen in virulentie. Dat is mogelijk door de schaalvergroting in het sequencen, maar wordt ook gedreven door inzichten die met analyse van sequentie data zijn verkregen: er zijn vaak grote genetische verschillen binnen soort, wat bijvoorbeeld ook betekent dat soortbepaling alleen vaak niet voldoende is voor een plantenziektekundige diagnose. Waar we vroeger onderzoek deden naar de rol van duplicatie of verlies van individuele genen, kijken we nu naar de rol van duplicatie en verlies van hele chromosomen, want het blijkt dat dit soort grootschalige veranderingen in sommige schimmels een rol speelt bij bijvoorbeeld fungicideresistentie. Dit inzicht is mogelijk door heel nieuwe sequencing-technieken. Voorheen werd DNA in kleine stukjes geknipt om die te sequencen waarna die stukjes weer aan elkaar gepuzzeld moesten worden. Dit leidde tot heel gefragmenteerde genomesequenties. Dankzij nieuwe technologie hoeft er niet of nauwelijks meer te worden geknipt en kunnen we hele chromosomen reconstrueren. Hierdoor krijgen we een veel beter beeld van de rol van genomestructuur en van structurele veranderingen in evolutie van schimmels.”

Waar gaan we naar toe?

Jan van Kan

“Door de grotere technische mogelijkheden en enorme hoeveelheden beschikbare data wordt vooruitgang in toekomstig onderzoek op het gebied van moleculaire plant-pathogeen interacties vooral beperkt door de biologische inzichten en creativiteit van de onderzoekers zelf. Een potentiële valkuil is dat onderzoekers vooral eerst hun eigen dataset ontwikkelen, maar daarbij onvoldoende gebruik maken van huidige beschikbare data. Er is soms meer (nuttige) informatie dan we beseffen, maar de tijd en middelen om die informatie te ontsluiten en optimaal te benutten ontbreken soms. De biologische complexiteit van plant-pathogeen interacties is moeilijk te bevatten door één persoon. Het vereist teamwerk, communicatie en vertrouwen in elkaars (aanvullende) expertises om echte vooruitgang te boeken.”

Like Fokkens

“Met de laatste technieken zijn we inmiddels heel goed in staat om complete genomesequenties te genereren. Deze technieken zullen hopelijk nog goedkoper en accurater worden. Van al die nieuwe data is het van groot belang dat het goed gedocumenteerd en vrij beschikbaar is. Dit is niet altijd eenvoudig, maar als we dat niet doen is het heel lastig voor andere onderzoekers om jouw data goed te interpreteren en eventueel te integreren in nieuw onderzoek. Zoals Jan terecht opmerkt, is het een valkuil om steeds nieuwe datasets te ontwikkelen en de verbinding met bestaand onderzoek kwijt te raken.

De belangrijkste *bottleneck* is het functioneel karakteriseren van al die eiwitten die gecodeerd worden op het genoom. Zoals Jan al zei, we hebben alle onderdelen, nu moeten we nog uitvinden hoe die onderdelen samenwerken. Dit is veel en veel moeilijker! Gelukkig zijn hier ook belangrijke ontwikkelingen, zowel in de biotechnologie als in de data-analyse. Een bekend voorbeeld is Crispr-Cas, een techniek waarmee we veel gemakkelijker mutanten kunnen maken om hun fenotype te bestuderen, en AlphaFold dat gebruikt maakt van kunstmatige intelligentie om de vorm en vouwing van eiwitten te bepalen. Er zijn speciale faciliteiten beschikbaar waarin we efficiënt en automatisch fenotypen kunnen bepalen. De nieuwe DNA-sequencing technologie kan ook worden gebruikt om moleculaire markerings op het DNA te herkennen, waarmee we de regulatie van genen beter in kaart kunnen brengen. Ook bij het integreren van al die verschillende typen informatie zal kunstmatige intelligentie een belangrijke rol spelen.”