



## ZELDZAME BACTERIËN

In één middag stukken DNA van duizenden bacteriën tegelijk bepalen. Dat kan met pyrosequencing. Hiermee verraden zeldzame micro-organismen voor het eerst hun aanwezigheid. Maar er zijn nog wel kinderziektes. 'In de bergen data wordt het bijna onmogelijk om fouten te ontdekken.'

HIDDE BOERSMA

“W

e zijn geïnteresseerd in de zeldzame bewoners van de mond”, vertelt Bart Keijser, microbiële genomicsonderzoeker bij TNO. In totaal nestelen zich naar schatting zo'n 600 tot 800 bacteriesoorten tussen en op je tanden. Tien daarvan omvatten echter 99 procent van alle cellen. Probeer je die microbiële gemeenschap te sequensen met de Sangermethode, waarmee ook het humane genoom gedaan is, dan krijg je alleen informatie over die tien soorten. “Daar weten we echter al veel van. We zijn juist geïnteresseerd in de zeldzame bewoners. Die blijken heel belangrijk, maar bleven tot voor kort onzichtbaar.”

Met een nieuwe methode om DNA-sequenties te bepalen, pyrosequencing, vind je die wel. De methode is vernoemd naar het pyrofosfaat dat vrijkomt tijdens de sequensing en dat zorgt voor een licht-

signaal. In tegenstelling tot bij de aloude Sanger-methode hoef je daarmee niet eerst alle stukken DNA elk in een eigen bacterie te zetten en op een agarplaat te laten groeien om het in stukjes gehakte DNA te scheiden. Dat maakte het oppikken van DNA van zeldzame bacteriën vrijwel onmogelijk. In meer dan 99,9 procent van de op agar gekweekte hulpbacteriën zitten namelijk de stukjes DNA van de meest voorkomende

**'Zeer zeldzame  
mond bacteriën helpen  
tandbederf voorkomen'**

bacteriën. En om de gewenste 0,1 procent zeldzame bacteriën te vinden, zou je dan miljoenen bacteriekolonies moeten analyseren. Dat is te arbeidsintensief.

Pyrosequencing maakt die scheidingsstap overbodig door alle te sequensen

stukjes DNA op een apart magnetisch bolletje te zetten, waarna ze zich apart van elkaar in een putje van een picotiterplaat nestelen. Een pyrosequencing run levert daardoor zomaar honderd miljoen basenparen op in slechts een halve dag, zonder de inzet van een gigantisch aantal analisten.

### VERKEERD GEBRUIK

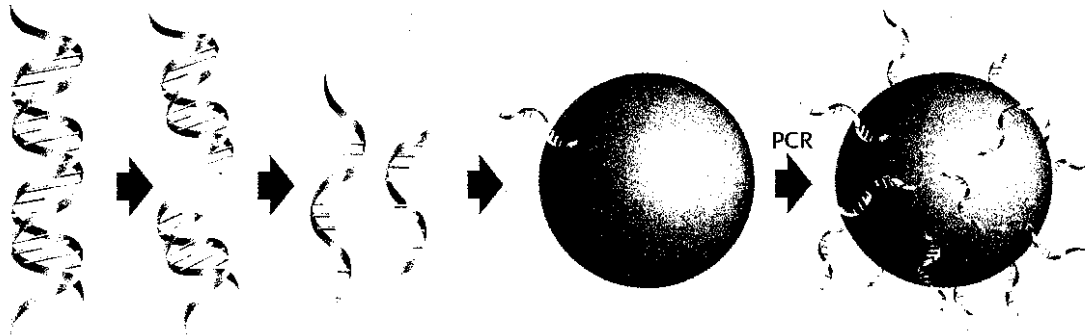
De pyrosequencingstechniek bestaat al sinds eind vorige eeuw, maar is pas een paar jaar geleden door microbiologen ontdekt. In het begin werd de techniek aangewend voor de verkeerde toepassing, zo beweert Keijser. Wetenschappers probeerden er in eerste instantie hele genomen van bijvoorbeeld mensen en dieren mee te sequensen. Daarvoor bleek de techniek echter niet erg geschikt.

“Een nadeel van pyrosequensen is dat je een verzameling heel kleine stukjes DNA verkrijgt”, legt Keijser uit. “De eerste apparaten kwamen niet verder dan 100

## HOE WERKT PYROSEQUENSING?

Stap 1

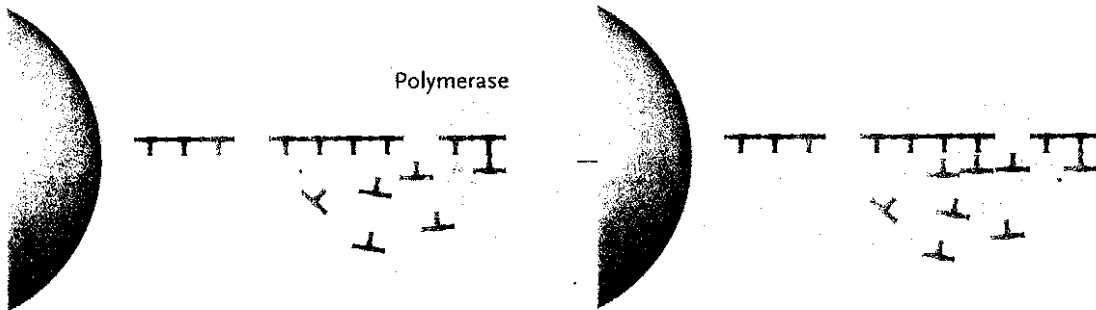
Bevestig enkelstrengs DNA aan een magnetisch bolletje.



Elk bolletje gaat vervolgens dankzij een magneet in een enkel putje, waarna de sequensing kan plaats hebben in de volgende stappen. Voeg daarbij steeds een van de vier nucleotiden, A, C, G of T, toe. Is het nucleotide complementair aan het enkelstrengs DNA ter hoogte van de polymerase, dan bindt deze. Bij die binding scheidt hij pyrofosfaat (PPi) af. Het enzym ATP-sulfurylase heeft dit nodig om energiedrager ATP te maken, wat op zijn beurt luciferase laat oplichten. Uit de intensiteit van dit signaal is vervolgens af te lezen hoe vaak hetzelfde nucleotide achter elkaar is geplaatst in de te bepalen sequentie.

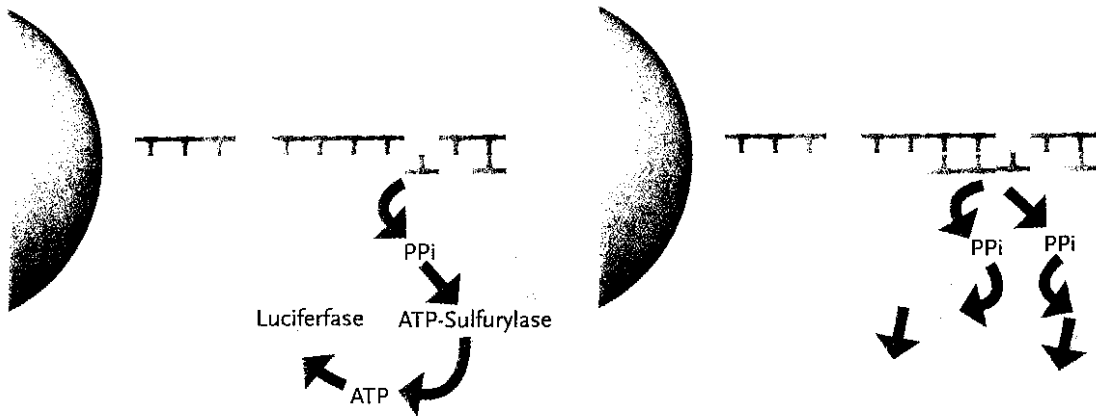
Stap 2a

Stap 3a

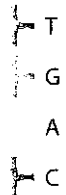


Stap 2b

Stap 3b



Legenda



► basenparen per aflezing. De laatste jaren is het gelukt om dat te verhogen tot zo'n 400, maar dat is nog steeds niet erg lang. Een volledig genoom aan elkaar rijgen op basis van overlappende stukken is hiermee moeilijk. Vooral gebieden met veel herhalingen zijn lastig, net als DNA met een hoog gehalte van één basenpaarcombinatie, zij het G-C of A-T.

De microbiologie kan echter uitstekend overweg met de kleine stukjes. Microbiologen kunnen bacteriën herkennen of nieuwe een naam geven op basis van slechts een paar honderd basenparen. Voor soortherkenning gebruiken ze vaak speciale signatuurdelen van het DNA, het 16S ribosomaal RNA-gen (16S rRNA). Dit gen is verantwoordelijk voor de aanmaak van ribosomen; elke bacterie heeft het dus. Het is zo essentieel dat er binnen een soort genetisch weinig verandert in de loop der tijd, terwijl er tussen soorten wel duidelijke verschillen zijn. Daardoor kun je met een klein stukje DNA bepalen tot welke bacterie het behoort. "Pyrosequencing is hiervoor dus ideaal en het gebruik ervan is de afgelopen jaren dan ook explosief toegenomen", stelt Keijser.

## BEVOORORDEELD

Een van die microbiologen is Jan Dirk van Elsas, hoogleraar microbiële ecologie aan de Rijksuniversiteit Groningen. "Van de 8.000 bacteriële soorten die er alleen al in slechts 1 g grond zitten, kennen we er ook nog maar heel weinig", weet hij.

"Vroeger werkten we alleen met cultiveerbare bacteriën die we kunnen laten groeien op een medium in een petri-schaal." Dat was heel beperkt: maar 1 procent van alle bodembacteriën laten zich kweken, zo is de schatting. "Via sequensen met de oude methode bereikten we de topduizend van de soortenrijkdom. Maar het betekent dat nog steeds een grote meerderheid van de bacteriesoorten zich verborgen houdt. De verwachting is dat die allerlei interessante stoffen produceren, zoals antibiotica en kankermedicijnen." Daarom is ook Van Elsas overgestapt op pyrosequencing.

"Pyrosequencing levert bovendien een minder scheef beeld op van de soorten-samenstelling", zo meent hij. "Doordat je minder stappen hoeft uit te voeren voor het DNA de machine ingaat, krijg je een beter inzicht in de daadwerkelijk aanwezige organismen en hun relatieve voorkomen." Niet alle stukjes DNA laten zich namelijk even makkelijk via een bacterie scheiden en vermenigvuldigen, het zoge-

noemde kloneren. "Met dit soort voorbereidingstappen introduceerde je in het verleden dus een bepaalde bias."

De kloonestap kun je bij pyrosequencing in zijn geheel weglaten, de kopieerstep (PCR) als voorbereidingstap is in sommige gevallen nog wel nodig. "Als we al het DNA uit de mond willen sequensen, krijgen we als we alles gaan pyrosequensen



## 'Pyrosequencing levert een overschatting van het aantal soorten'

wederom alleen maar de meest abundantste soorten in beeld", zegt Keijser. Hij kopieert daarom eerst het 16S rRNA-gen van alle bacteriën, voordat hij gaat sequensen.

"In de bodem is hetzelfde noodzakelijk", voegt Van Elsas toe. Een groot gedeelte van de sequenties vertegenwoordigt nog steeds de meest voorkomende soorten. "Maar als je maar genoeg sequenst, dan zullen ook de meest zeldzame soorten tevoorschijn komen."

In omgevingen waar de diversiteit niet zo hoog is, en waar je niet te maken hebt met een kleine groep bacteriën die het grootste deel van de cellen vertegenwoordigen, is de voorbereiding zelfs helemaal te vermijden, inclusief de PCR-stap, stelt prof. Gerhard Herndl van het Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee (NIOZ) op Texel. "Wij halen het DNA rechtstreeks uit zee en gooien dat over de pyrosequenser", zegt hij. "Vervolgens zoeken we daar de stukken van het 16S rRNA-gen uit. Er is dan nog minder sprake van die bias."

## FUNCTIE

De diversiteitsstudies die de drie microbiologen hebben uitgevoerd, hebben een schat aan nieuwe informatie opgeleverd. Nu is het tijd voor de volgende stap, zo vindt Keijser. Zo'n signatuurgedeelte zegt namelijk nog niks over de eventuele functie van het organisme.

Die informatie valt echter wel degelijk uit de wirwar van 16S rRNA-gensequenties te halen, zo denkt hij. Keijser doet dit door

bijvoorbeeld de microbiële diversiteit van heel veel monden naast elkaar te leggen. "Als je alle condities meeneemt in statistische analyses – zoals wel of geen vullingen of melktanden – kun je erachter komen welke bacteriën belangrijk zijn om tandbederf te voorkomen, zonder de bacterie overigens echt in haar kraag te grijpen."

De TNO'er ontdekte dat daarvoor drie volledig onbekende bacteriën – waarvan er maar een paar cellen per soort in je mond voorkomen – van belang zijn. Dat pleit de weg naar echte preventieve tandarts-geneeskunde. "Als een tandarts met een simpele test waarneemt dat die bacteriën niet meer aanwezig zijn, kan hij bijvoorbeeld voedsel voorschrijven dat die micro-organismen bevat en zo tandbederf voorkomt. Zonder pyrosequensen waren we hier nooit achter gekomen."

## KOUDWATERVREES

De grote hoeveelheid nieuwe basenparen heeft ook een nadeel: er is te veel informatie om te analyseren. "Niet alleen is het af en toe zoeken naar een speld in een hooiberg", zegt Herndl, "het wordt ook bijna onmogelijk om fouten te ontdekken." Vroeger werden alle sequenties met de hand nagekeken en daar is nu bijna geen beginnen meer aan.

"Wij vonden onlangs in diep water een grote hoeveelheid bacteriën die afhankelijk zijn van zonlicht en dan weet je dat er iets fout is", vertelt Herndl. "Het zal echter vaak genoeg gebeuren dat je er niet achterkomt. Als je niet oppast, accumuleren dat soort fouten in de soortendatabase."

Herndl is ook kritisch op het aantal gevonden zeldzame bacteriën. "Het is ecologisch niet te verklaren dat er van zoveel soorten maar één stuk DNA en dus één cel aanwezig is. Bacteriën moeten een keer delen en dus moeten er ook dochtercellen zijn." Hij denkt dat een klein foutje gemaakt door het apparaat voor een overschatting van het aantal soorten kan zorgen. "Andere wetenschappers brengen daar tegenin dat dit effect ook simpelweg veroorzaakt kan zijn door onderbemonstering en dat we het DNA uit die dochtercellen nog wel tegenkomen als we maar meer gaan sequensen", zegt hij.

"We zullen het antwoord binnenkort ongetwijfeld weten." Mochten onderzoekers het dochter-DNA niet tegenkomen, dan is het toch zaak om de sequenties handmatig langs te gaan om op fouten te checken. Tijdelijk, want computerprogramma's die de fouten opsporen zijn al in de maak, weet Van Elsas.