

Experimentele klinische chemie: DNA, en wat RNA komt

Rede uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt van hoogleraar Experimentele klinische chemie aan het VU Medisch Centrum te Amsterdam op dinsdag 4 oktober 2011

door prof. dr. Cees B.M. Oudejans

'De stok kiest de tovenaar, meneer Potter'.

Sw, Sk en Sk

Gegeven leven,
Bladeren ontworsteld aan de tak,
Spruiten ontworteld van de stam,
Gedragen door de vrije wind.

Weerloos, dierbaar.
Dankbaar, vandaar.

De tijd zuchtte zacht.
Het pad
ontstond
door het te lopen.

*Mijnheer de rector magnificus
Zeer gewaardeerde toehoorders
Lieve familie, vrienden en vriendinnen
Dear distinguished guest of honour*

Waarom

'Ik denk, dus ik ben', zei Descartes.

'Ik draag, dus jij bent er straks', zei de zwangere vrouw.

'Maar het is niet zo puik in je buik, mamma!' antwoordde het kind benauwd.

'Daar moet toch wat aan te doen zijn?' dacht de professor.

De eerste negen maanden zijn de belangrijkste in je leven. Dit stelt Dick Swaab, gelouterd hersenonderzoeker in zijn bestseller *'Wij zijn ons brein'*. Ik ben het hartgrondig met hem eens. Meer dan dat. Afwijkingen in de processen tijdens de vroege ontwikkeling van het ongeboren kind zijn bepalend voor wat er later in je leven gebeurt. Omgekeerd leidt onderzoek van de normale ontwikkeling tot onverwachte nieuwe aangrijpingspunten voor volwassen ziekten zoals kanker, hart- en vaatziekten, en dementie. Mijn eerste boodschap van vandaag: 'We zoeken 30 jaar te laat naar de oorzaak van volwassen ziekten'.

Ik ga u testen. U ziet een foto van een weefselplakje met daarin gekleurde cellen waarvan de kern en vorm sterk veranderd zijn. De lokatie van de cellen is rond en in de bloedvaten. De cellen zijn sterk invasief; dat wil zeggen, ze verplaatsen zich naar posities waar ze normaal niet thuishoren. Over de grens op stap. Zijn dit volgens u kankercellen of niet?

Nog een test. U ziet hier een plaatje met daarin de doorsnede van een vaatwand met daarin alle kenmerken van aderverkalking. Hoe oud denkt u dat de betreffende persoon is? Een jong volwassen vrouw van 25 jaar die nog nooit heeft gerookt, of een persoon van 65 jaar die een pakje per dag rookt?

Daarom

Ik word niet alleen gedreven door wetenschappelijke nieuwsgierigheid. Wetenschap bedrijven in deze tijd is uniek. Vroeger had men de industriële revolutie. Daarna moest men eeuwen wachten op de volgende. Momenteel vinden er meerdere revoluties tegelijk plaats in een tijdsbestek van jaren. Momenteel zelfs in weken. Ik noem: de ontdekking van het recombinant DNA waardoor men opeens stukjes erfelijk materiaal naar wens kon africhten en kunstjes laten doen in het laboratorium. De ontdekking van de PCR reactie, waardoor men opeens kleine hoeveelheden erfelijk materiaal naar wens een miljoen- tot miljard maal kon vermenigvuldigen. De digitale ontwikkelingen: internet, laptops, E-mail, google, mobiele telefoon. Je hele platencollectie, zonder krassen, in je broekzak. De wereld onder muisbereik. Een wapenarsenaal van jewelste. De laatste 2 jaar is daar de ontwikkeling van de zogenaamde tweede generatie DNA sequencers bijgekomen. De derde generatie zit er al aan te komen. Ik laat straks zien hoe dat heeft geleid tot een doorbraak in de diagnostiek van aangeboren afwijkingen. In dit verband is de aanwezigheid vandaag van professor YM Dennis Lo van de 'Chinese University of Hong Kong'

als 'distinguished guest of honor' mij zeer dierbaar. Hij is niet alleen bloedje slim, hij is ook zeer aardig. Het kenmerk van de ware groten.

Mijn motivatie is ook persoonlijk. 'Mijn vrouw en ik hebben drie gezonde kinderen, en twee bijzondere kleinkinderen. Ik gun dat voorrecht andere echtparen ook'. Een zwanger echtpaar dat, omdat de Tom-Tom van moeder Natuur en vadertje Tijd even de verkeerde route aangaf, een gecompliceerde zwangerschap of een aangedaan kind krijgt kan daar niets aan doen. Het overkomt hen. Ik vind het een voorrecht dat ik mijn energie en talenten daarvoor mag inzetten en zal dat blijven doen. Ik vind het nog steeds hartverscheurend als ik in mijn kamer, PK1BR012, met de deur halfopen, op de brug van het VUmc een huilend kind hoor dat door de gang rijdt op weg naar de kliniek. 'Alles wat van waarde is, is weerloos' zei Lucebert al. Oftewel, ik doe wat ik doe omdat ik kan doen wat ik ben. Vrijheid in beperking. Het VU Medisch Centrum heeft me daartoe alle kansen gegeven.

De ware kracht slaat niet hard maar raak

Het begin van het pad dat ik heb gelopen werd me geduid. Professor Stolte zag het voordat ik ziende was. Het pad onstond door het te lopen. Ik liep samen met betrokken collega's van wie ik veel geleerd heb. Dit betrof ook afleren. De collega's, die wijsheid en intelligentie paarden aan daadkracht met reflectie en visie, ben ik bijzonder dankbaar. Zij die zichzelf het minst serieus namen, nam ik het meest serieus. Met velen heb ik ontegenwoordig veel lol gehad. Mensen die mij kennen weten dat er van mij filmpjes op YouTube staan met het bewijs dat ik mezelf ook niet altijd serieus neem. 'Is hij wetenschapper? Nee, dat meen je niet!' Ik zeg ook altijd: 'Ik ben MD, PhD. Dat staat voor afgestudeerd aan MacDonalds, met als specialisatie Pizza Home Delivery'. Ik sta hier vandaag alleen, maar mede namens en dankzij hen/jullie. Chris Meijer, Han Stroes, Ruud Schutgens, Rien Blankenstein, dank jullie wel voor de raad en steun. College van Bestuur van de Vrije Universiteit, en Raad van Bestuur van het VU Medisch Centrum, dank voor het vertrouwen. Collega's van de klinische chemie, verloskunde, genetica, pathologie, kindergeneeskunde en vele anderen binnen en buiten het VUmc: dank!

De basis die ik kreeg was doortimmerd. Mijn vader Wim deed zijn dingen met passie, plezier en perfectie. Een vakman in hout, maar hij was niet van hout. In alles mens. Hij kende de VUmc kernwaarden al voordat ze geformuleerd waren: betrokken, ambitieus en zorgvuldig. Mijn moeder Alie zit vandaag op de eerste rij. Dat is niet haar liefste keus. Het liefst zit ze achterin. Dat zegt genoeg. Stille kracht uit een sterk geslacht. Zij puzzelt graag, nog steeds. Ik ook, maar dan betaald.

Het moment dat ik me ten volle realiseerde wat het VUmc uniek maakt was het moment dat mijn vrouw Ineta borstkanker kreeg en ik samen met haar het ziekenhuis aan de andere kant van het loket meemaakte. Het VUmc bleek artsen, zoals een radiologe, in dienst te hebben die de kernwaarden mededogen, erbarmen en empathie in haar genen had zitten. De tijd werd genomen, ver na kantoortijd, begrip en inlevingsvermogen getoond, en deskundig advies gegeven om een voor mijn vrouw zeer ingrijpend besluit te nemen. De inleving van de

betrokken arts was een beleving. Het uiteindelijk genomen besluit en afgesproken behandeltraject voelden hierdoor veilig, verantwoord en vertrouwd. Mijn vrouw is sterker uit dit traject gekomen. 'Dat was ons niet vernietigt maakt ons sterker' (Nietzsche).

Ik ben dankzij mijn vrouw Ineta sterker uit mijn traject gekomen en op mijn pad gebleven. Zij houdt onvoorwaardelijk van mij en is altijd in mij blijven geloven. De kracht van kwetsbaarheid. De ware kracht slaat niet hard, maar raak.

Teamwork: Bazinga!

Maar terug naar de feiten. 'Wat heb je nu al die jaren met ons geld gedaan?' Want ook in de wetenschap geldt de regel 'He who has the gold makes the rules'. Als u mijn AEX index zou willen weten en meten dan kan ik u zeggen dat het rendement van mijn groep hoog ligt. Ik heb nooit een zeer grote groep gehad, dat ook nooit gewild -het is me ieder geval nooit overkomen-, heb jaren uit de wind moeten zeilen, maar op veel momenten bleek 'Als je alleen of met een klein gezelschap reist, reis je sneller'. Mijn team daag ik nog steeds uit slimmer dan hun baas te zijn. Mijn post-doc Marie van Dijk heeft dat letterlijk genomen en gaat nu als een speer. Een VENI subsidie in haar rugzak. Mijn analiste Joyce Mulders is van het slag dat perfectie aflevert. Mijn analiste Allerdien Visser komt proactief met voorstellen. Ankie Poutsma is van het type 'Van dik hout zaagt men planken en bouwt men huizen'. Veel werk, graag. Omar Abdul-Hamid is diegene die met een walkman zingend door de gang loopt. 'Do I need to say more?' Zijn pogingen om eerder op het werk te zijn dan zijn baas zijn echter nog niet gelukt. Janny Posthuma doet fluitend de diagnostiek. Haar lachsalvo's dringen door tot in mijn kamer. De promovendi Daan van Abel en Hari Thulluru zal ik gaarne in mijn nieuwe status de bul overhandigen in de komende jaren.

Moederkoek of vaderkoek

Ik begon bij de moederkoek, de placenta, en ben daar nooit mee opgehouden. Een bizar orgaan. Een tijdelijk orgaan. Maar wat een scala aan essentiële functies, bizarre regelmechanismen, foptrucsjes, het doet vrijwel alles behalve denken en lopen. Hoewel lopen?

Tijdens de aanleg van de vroege placenta komt dit weefsel in direct contact met het weefsel van de baarmoeder in het begin van de zwangerschap. In de eerste weken van de zwangerschap *lopen* cellen hiervan in de richting van de bloedvaten van de moeder. Deze bloedvaten, spiraalarteriën genoemd, voeren de voeding aan voor het kind gedurende de gehele zwangerschap. De placenta cellen -het zijn dus cellen van het kind maar die buiten het kind gelegen zijn, vandaar de naam extra-embryonaal - zorgen middels een bizar en intrigerend proces met kenmerken van tumorgroei, transplantatiereacties, stollingsprocessen en hormoonproductie, tot een essentiële verandering in de bloedvaten van de moeder. De wand van de bloedvaten wordt deels verwijderd, daarmee verbreed, het vat verandert van nauw tot breed en wordt deels losgekoppeld van de invloed van de moeder. 'Het kind neemt de controle over van de moeder over zijn eigen bloedtoevoer'. De bedoeling is duidelijk en zeer essentieel: er wordt een verbinding tot staan gebracht tussen de bloedcirculatie van het kind en de moeder via de placenta. Bij dit proces worden er zelfs genen

die het kind van de vader krijgt selectief aangezet, terwijl die van de moeder worden uitgezet. Inderdaad, moet men niet spreken van een vaderkoek? Dit proces vindt in alle zwangerschappen plaats, maar gaat mis in 5-10% van de zwangerschappen. De wandelende placentacellen houden hun pas in, en doen maar ten dele wat er had moeten gebeuren. Het gevolg, de noodzakelijke veranderingen in de bloedvaten van de moeder vinden maar halfbakken plaats, het vat blijft ten dele nauw, de toevoer van voeding en zuurstof naar het groeiende kind wordt in toenemende mate beperkt en het kind meldt op een gegeven moment: 'Ik heb het niet zo puik in je buik, ma!' De placenta gaat als reactie hierop stoffen uitscheiden als alarm signaal. De moeder schiet te hulp door haar bloeddruk te verhogen (hypertensie), maar komt daarmee zelf ook in de problemen. Haar hulp aan haar kind heeft een grens. Haar vaten (endotheel beschadiging) en nieren (eiwit uitscheiding) raken beschadigd. Pas op dat moment, veel te laat, want het is weken tot maanden na het begin van het ontstaan van het probleem, meldt de dokter 'Mevrouw, u heeft pre-eclampsie'. Dit is de paradox van pre-eclampsie. Een laat klinisch verschijnsel bij de moeder, een vroeg oorzakelijk begin bij het kind, de placenta. 'The fetal origin of maternal disease'.

'It takes two to dance'

Wij pasten deze zienswijze ('Zoek vroeg in de zwangerschap, zoek in de placenta') consequent toe in ons onderzoek naar de oorzaak van pre-eclampsie ('We wijken niet af van onze hypothese tot het tegendeel bewezen is'). We werden daarbij geholpen door een unieke collectie aan DNA samples die in de jaren 1995-1997 met veel moeite en inzet door collega Guus Lachmeijer, nu werkzaam bij de afdeling Klinische Genetica, waren verzameld. Zij had een zeer groot aantal families (150) met pre-eclampsie weten te traceren, met in elke families twee aangedane zussen of nichten, van de patiënten en ouders DNA verzameld en de klinische gegevens zeer goed in kaart gebracht. Immers, het is bekend dat bepaalde vormen van pre-eclampsie in het bijzonder de ernstige vormen die vroeg in de zwangerschap klachten geeft met ernstige groeivertraging bij het kind vaker in bepaalde families voorkomt. Dit betekent dat het erfelijk is.

We deden echter een ding anders. In onze genetische screening keken we niet alleen naar het samenvallen van markers tussen de aangedane zussen, maar keken ook hoe die doorgegeven werden aan de kinderen geboren uit de aangedane zwangerschappen. Voor dit doel zijn wij op tournee gegaan in het land om DNA bij de kinderen te verzamelen via een wangslimvliesuitstrijk. Alle ouders en hun kinderen bijzonder hartelijk dank voor hun enthousiaste medewerking en warm onthaal.

Dit is wat men namelijk doet bij genetisch koppelingsonderzoek. Men kijkt naar de variaties die ieder van ons heeft, doet dat voor alle chromosomen en zoekt daarbij naar die variaties die binnen elke familie tussen de aangedane patiënten identiek zijn en hoe die doorgegeven worden door de ouders. Dit kunstje hadden we goed afgekeken van Peter Leegwater en Jan Pronk, die werkend in de groep van Marjo van der Knaap zeer succesvol waren geweest in het vinden van de oorzakelijke genen voor ernstige hersenafwijkingen bij het kind.

In ons onderzoek viel echter meteen een ding op: de vader leek er niet toe te doen. Sorry, heren. In het chromosoomgebied waar het gen moest liggen, bleken alleen die genen die de moeder doorgaf aan haar aangedane kind ertoe te doen. Dit verschijnsel staat bekend als een 'parent-of-origin effect' en is in de ontwikkeling van het ongeboren kind niet ongewoon, zelfs essentieel, en staat bekend als 'genomic imprinting'. We hadden toen wel een nieuw probleem, maar namen onze toevlucht tot een list. 'Tom Poes, verzin een list'.

Er bestaat een zwangerschap die bekend staat als molazwangerschap. Hij komt in Nederland weinig voor, maar zeer vaak in Azië in landen als Japan en Indonesië. Het ontstaat doordat een (vrouwelijke) eicel, waarin om onduidelijke redenen de celkern ontbreekt, bevrucht wordt door een (vaderlijke) zaadcel die zich vervolgens verdubbelt. Het gevolg: het complete erfelijke materiaal in de bevruchte eicel is alleen van de vader afkomstig. Er ontstaat dan weliswaar een zwangerschap, maar die bestaat alleen uit een placenta (u denkt het al: 'vaderkoek'), maar geen embryo. Wij gebruikten dit weefsel voor de zoektocht naar het gen verantwoordelijk voor pre-eclampsie. Als het namelijk een gen was dat via de moeder wordt doorgegeven, zou het niet aanwezig zijn in de vaderkoek. Dat bleek zo te zijn. Daarna werd het 'makkelijk'. Twaalf kandidaat genen als kleuterjes op het hek, elf vielen eraf en een viel niet op zijn bek. Dit was het STOX1 gen. Er moest nog wel eerst een hoop gesequenced worden. We hadden er lol in om dit gen, het bleek verwant te zijn aan de zogenaamde Forkhead box genen, Storkhead box te noemen met een knipoog naar de ooievaar. Tot onze schik werd die naam door de HUGO naamgevings commissie geaccepteerd.

Het STOX1 gen codeert voor een transcriptiefactor. Het eiwit dat het produceert bindt als een aan- en uitschakelaar aan andere genen en zorgt daarbij dat die vervolgens aan- of uitgezet worden. De vinger die de lichtsakelaar bedient. Dit kunnen honderden tot duizenden verschillende genen zijn. Dus meer: de hand die de hoofdsakelaar bedient. Door een foutje in de afleescode van het STOX1 eiwit, zoals dat voorkomt in de door ons onderzochte Nederlandse vrouwen met pre-eclampsie, wordt de binding van dit eiwit aan de andere genen verstoord en de functie daarvan veranderd. Vergelijk het met het volgende. Als u naar ons huis rijdt ziet u de firma 'Ranzijn, Tuin en Dier'. Een kleine verandering in de laatste letter maakt het effect compleet anders: 'Ranzijn, Tuinendief'.

Verder onderzoek van Marie van Dijk, tijdens haar verblijf in het Samuel Lunenfeld Institute in Toronto, bracht aan het licht dat een van de effecten van het veranderde STOX1 gen, via een celadhesie molecuul op de lopende placenta cel, maakt dat het te vroeg stopt met lopen. Pas op de plaats, geen verandering in de noodzakelijke aanpassingen van de moederlijke bloedvaten, de hulpreactie van de moeder volgt met uiteindelijk het klinisch beeld van hoge bloeddruk en eiwituitscheiding. Wij zijn er echter nog niet. Het plaatje is nog niet compleet, we missen nog steeds een tweede factor. STOX1 is weliswaar essentieel, maar niet voldoende voor het ontstaan van pre-eclampsie. 'It takes two to tango'. We hebben een mogelijke tweede boosdoener op de korrel en hopen daarmee in de komende jaren eindelijk onze belofte aan de patiënten en aan de stichting HELLP syndroom te kunnen inlossen.

Verwacht het onverwachte, maar doe niet het onwaarschijnlijke

Het chromosoomgebied, waarin het voor pre-eclampsie verantwoordelijke gen lag, bleek een aantal genetische kenmerken te hebben dat ook beschreven was voor de late vormen van de ziekte van Alzheimer, de vormen die boven de 65 jaar beginnen. Wat vreemd, want waarom zou er een verband kunnen bestaan tussen twee ziektebeelden die zo extreem verschillend zijn in verschijnselen, type patiënten en aangedaan orgaan? Toen bleek ook dat de expressie van het STOX1 gen bijzonder hoog was in hersenweefsel. Een toevalsbevinding? We besloten dit verder te onderzoeken. Mijn afdelingshoofd, Rien Blankenstein, vond dat gelukkig ook. Het STOX1 gen bleek verhoogd tot expressie te komen in die gebieden van de hersenen die bij de late vormen van Alzheimer het eerst zijn aangedaan, en daar een geconserveerde 'pathway' te beïnvloeden met een effect op een klein eiwit dat voor het ontstaan van Alzheimer essentieel is, het zogenaamde amyloid eiwit. Momenteel is Daan van Abel hard bezig om hier meer inzicht in te krijgen.

Een duidelijker bewijs van hoe onderzoek in de vroege ontwikkeling kan leiden tot nieuwe inzichten of aangrijpingspunten voor zogenaamde volwassen ziekten kan ik niet geven.

Oki en Doki vinden een schat: de heilige graal

Het onderzoek van de placenta werd ook gedreven door een lang gekoesterde wens van de patiënten en dokters: niet invasief onderzoek van genetische aandoeningen bij het kind via een simpele bloedtest. Men wist immers al jaren dat er cellen en erfelijk materiaal van het kind via de placenta in de bloedsomloop van de moeder komen tijdens de zwangerschap. Dit was al een eeuw geleden aangetoond. Het idee was dus simpel: we vissen de cellen van het kind of delen daarvan uit het bloed van de moeder, bekijken die op de inhoud en beoordelen of daar een afwijking in zit. We kregen daar snel de handen voor op elkaar en hadden een sterk team, John van Vugt als hoofd van de prenatale diagnostische unit, Inge van Wijk als post-doc en Monique Mulders en Sandra Griffioen als analisten in mijn lab en later Attie Go als promovendus en Allerdien Visser als analiste. De keuze was om eerst in te zoomen op de meest voor de hand liggende optie: de circulerende trofoblastcellen, de buitenste laag van cellen van de moederkoek. Dit bleek goed te lukken, als je een cel zag, kon je zeker vaststellen dat het een cel van het kind was en ook de afwijkingen daarin, maar het aantal bleek te laag, en daarmee onvoldoende in alle zwangerschappen om te leiden tot een bruikbare techniek die toegepast kon worden in de kliniek. Dit leek de dood in de pot. Veel labs haakten af, zowel in Nederland als in de rest van de wereld. Zij hadden dezelfde ervaring. Wij bleven doorgaan, maar niet tegen beter weten in.

Een doorbraak en daarmee omslag, kwam in 1997. Professor Dennis Lo, destijds in Oxford, en nu zeer succesvol in zijn geboorteland Hong Kong ('ik miste het eten') toonde aan dat je niet naar de cellen in de celfractie moest zoeken, maar in dat deel van het bloed dat geen cellen bevat, het plasma. Daarin zitten pakketjes van afgesnoerde celfragmenten (exosomen) van de placenta, netjes ingepakt en daarmee beschermd, die al het erfelijk materiaal (DNA en RNA) van het kind bevatten, in de plasma fractie in een grote hoeveelheid aanwezig zijn en middels moderne DNA technieken goed te analyseren zijn op inhoud. Het veld veerde op. Wij ook. En we waren goed voorbereid. Van laatste der Mohikanen werden we

spekkoper. In 2003 was al gestart met het aanleggen van een grote biobank van plasma samples die we verzamelden van alle zwangeren in het eerste trimester die voor onderzoek naar het prenataal diagnostisch centrum van ons ziekenhuis kwamen.

Na omzwervingen via RNA, en ingewikkelde testen, die goed maar niet bij alle zwangere vrouwen werkten, kwam de doorbraak twee jaar geleden met de introductie van de tweede generatie DNA sequencers en de voorzienige blik, intelligentie en wervend vermogen van Dennis Lo. Wij, onze collega Kypros Nicolaides in London en Dennis in Hong Kong hadden voldoende samples (we hebben er inmiddels meer dan 3000 in de vriezer) om, toen eenmaal bewezen was door Dennis Lo en Rossa Chiu dat met deze methode vroeg diagnostiek van het syndroom van Down zeer goed mogelijk was, de ultieme proef uit te voeren. Die werd in 2010 in Hong Kong uitgevoerd door het team van Dennis die middels een Center of Excellence grant van de Chinese University of Hong Kong hiertoe in staat was. In een studie van bijna 800 zwangere vrouwen met daarin ongeveer 90 bewezen gevallen van zwangerschappen met een kindje met het syndroom van Down werd met bijna perfecte nauwkeurigheid de aan- of afwezigheid vastgesteld. Er was in Hong Kong in ploegendienst doorgewerkt.

Het principe is al volgt. Tijdens de vroege zwangerschap (week 9-13) wordt bloed van de moeder afgenomen via een standaard prik in de arm. Het bloed wordt opgewerkt met verwijdering van de cellen. Dit gebeurt door de buizen af te draaien in een centrifuge. Uit de overgebleven fractie (plasma) wordt vervolgens al het DNA geïsoleerd. Dit DNA komt uit de pakketjes (exosomen) en bevat zowel moederlijk DNA (90%) als DNA van het kind (10%). De uiteinden van al dit DNA worden vervolgens gepolijst, hieraan worden stukjes synthetisch DNA geplakt die daarna door een combinatie van enzymen en DNA stukjes complementair aan dat wat we er zelf aangeplakt hebben herkend en afgelezen worden wat leidt tot een gelijktijdige miljoenvoudige vermenigvuldiging van het oorspronkelijke DNA. Al deze DNA fragmenten worden vervolgens op een drager 'geplakt' en in een zogenaamde Massively Parallel Sequencer gelijktijdig gedurende een aantal dagen in delen gekopieerd, waarbij alles wordt afgelezen. Het eindresultaat is een meerdelige encyclopedie met daarin de erfelijke informatie van het beginmateriaal geschreven in 4 letters, A, C, G en T. Met gezond verstand, een krachtige computer en een paar computer wizkids worden vervolgens alle pagina's geordend, vergeleken met de standaardwerken, en gefilterd op spelfouten waarna het lezen kan beginnen. Dit lezen is niets anders, nadat alle pagina's in de juiste volgorde zijn gezet, dan kijken of er van de pagina's waarop de informatie vermeld staat van bijvoorbeeld chromosoom 21 meerdere pagina's aanwezig zijn. Op deze wijze bleek dat je met vrijwel perfecte nauwkeurigheid (we misten geen enkel geval een kind met het syndroom van Down, en dachten slechts in 3 van de 1000 gevallen onterecht dat het er een was), via de bloedtest niet invasieve prenatale diagnostiek (NIPD) voor het syndroom van Down kon toepassen. We weten nu ook dat deze test ook geschikt en nauwkeurig is voor de andere twee vaak voorkomende trisomieën, trisomie 13 en 18. Tezamen zijn deze genetische afwijkingen verantwoordelijk voor het merendeel van de genetische afwijkingen bij het ongeborn kind. De implicaties zijn enorm, de test kan (en moet) de huidige eerste trimester combinatie-test vervangen. Van een kansberekening is de test een diagnostische geworden. De

test voldoet aan alle voorwaarden die je van een goede test mag verwachten. Hij is niet invasief (bloedtest), kan bij alle vrouwen in het eerste trimester toegepast worden, geeft directe informatie, is niet afhankelijk van het ras van de patient, of het geslacht van het kind, pikt geen signalen op uit eerdere zwangerschappen, kan geautomatiseerd worden, en zal door de snelle ontwikkelingen in de DNA sequencers snel zeer goed betaalbaar zijn tegen een prijs die in de buurt komt van de huidige combinatietest. De oplettende lezers zal al zijn opgevallen dat Dennis Lo in zijn artikels waarbij 'Massively Parallel Sequencing' (MPS) is toegepast op zwanger bloed dit vermeldt als 'Maternal Plasma Sequencing' (MPS). Hij heeft recht van spreken, zijn artikel is de eerste in zijn soort waarbij MPS in een grootschalige klinische setting zijn belofte als aanstormend talent deed nakomen.

Het principe is toepasbaar op alle andere vormen waarbij er vreemd of veranderd DNA in het bloed komt. Denk aan tumorcellen of fragmenten daarvan bij kankerpatiënten die losraken en in de lichaamsvloeistoffen verslept worden. Wij hadden het relatief gemakkelijk. We keken immers naar de extra aanwezigheid van een geheel chromosoom. Bij kankerpatiënten zijn dat kleine afwijkingen. Het is echter een kwestie van tijd dat dit ook mogelijk gaat worden: het vinden van de kleinere spelden in de hooiberg. Ook voor veel genetische afwijkingen bij het kind geldt dat. Kleinere afwijkingen zijn nu nog niet detecteerbaar via deze test in het bloed, maar ook dat wordt slechts een kwestie van tijd voordat deze hobbel genomen is.

Veel onnodig leed zal voorkomen worden. Verlaging van het aantal van onnodig uitgevoerde invasieve testen (vlokkentest en vruchtwaterpunctie). Geen onzekerheid en angst bij de zwangere en moeilijke discussies met de dokter over de interpretatie van de test zoals nu het geval is met de combinatietest. Maar wordt daarmee de gezondheidszorg niet veel duurder? Nee, in tegendeel. Betrouwbaarder? Ja zeker. Veiliger? Wis en waarachtig. Minder sterfte? Jawel. Worden er een of meerdere testen vervangen? Inderdaad. Daarbij komt nog dat in Nederland de prenatale screening uniek georganiseerd is en goed gereguleerd met een organisatie in 8 regionale centra gekoppeld aan de Academische ziekenhuizen, en bij wet geregeld.

Zorgen voor de geest kost het meest

Het belang hiervan is enorm voor het welzijn van de patienten en andere betrokkenen (ouders). Het geldelijk belang is ook van belang en tegenwoordig een punt van zorg in de zorg. De kosten van de gezondheidszorg bedroegen in 2005 68,5 miljard Euro. Dat is 13,5% van het Nationaal Bruto Produkt, omgerekend 4200 Euro per inwoner. Hiervan zijn de kosten voor verstandelijke handicaps de hoogste (nummer 1) zijnde 8% van het budget ('Zorgen voor de geest, kosten het meest').

De komende jaren worden daarom om meerdere redenen beleidsbepalend. Alle handen worden momenteel in elkaar geslagen door alle academische centra met de betrokken DNA laboratoria en klinische afdelingen (Verloskunde en Genetica) in Nederland om een unieke grootschalige studie op te starten bij bijna 10.000 zwangeren, inclusief de vrouwen onder de 36 jaar, om de betrouwbaarheid van de nieuwe DNA test te toetsen in de dagelijkse praktijk. De zoektocht naar de niet

invasieve test voor het Down syndroom heeft 15 jaar geduurd. De implementatie in de kliniek hopelijk korter.

DNA, en wat RNA komt

Een van de kenmerken van de aanpak van de DNA test voor het syndroom van Down is dat men informatie kan krijgen over het gehele genoom, dat wil zeggen alles wat er aan erfelijke informatie in elke cel zit. Als men dit vergelijkt met de tot nu toe gebruikelijke aanpak waarbij men inzoomt op eiwitten is het verschil duidelijk. Er wordt slechts twee procent van het genoom vertaald in eiwitten. Vergelijk dit met de volgende situatie. Er is bij u ingebroken. Alles is weg. Er zijn vingerafdrukken in uw huis gevonden, maar er zijn honderd verdachten. U krijgt nu 2 opties: a. u mag bij slechts 2 personen de vingerafdrukken afnemen, of b. bij alle 100. Welke optie kiest u?

Niet coderend, wel relevant

Dit fenomeen blijkt nu ook van toepassing op die delen van het genoom die worden afgeschreven in RNA, maar vervolgens geen eiwit maken. Eerst dacht men namelijk dat grote delen van ons erfelijk materiaal er niet toe deden, afval, prullenbak DNA. Het zit er maar, maar doet niets. Hier is men de laatste jaren van teruggekomen. Ook dit was een gevolg van de introductie van de MPS. Toen men beter kon en ging kijken bleken er veel meer delen van ons genoom actief te zijn dan men voorheen dacht. Ongeveer 95% van ons erfelijk materiaal wordt gedurende enige periode in ons leven afgeschreven als RNA, waarvan het merendeel geen eiwit maakt, het zogenaamde niet coderende RNA, non-coding RNA. Dit betekent dat er nog een gigantische onontgonnen laag aan nieuwe biologische informatie in ons erfelijk materiaal verstopt zit. Men begint nu pas te begrijpen wat het is, wat het doet, waar het zit en wat het effect kan zijn op ziekteprocessen, en hun bruikbaarheid voor nieuwe diagnostiek en therapie. De techniek helpt ons daarbij enorm. We hoeven niet vooraf te kiezen, 'Als eruit komt wat je verwacht, is het meestal fout' zei mijn professor altijd. We hebben nu de mogelijkheid dat we eerst alles in kaart brengen en dan pas gaan selecteren op de informatie die bruikbaar is.

HELLP

Een nieuwe klasse van de niet-coderende RNA vormt de zogenaamde macroRNAs, zo genoemd omdat ze groot (macro) zijn. Ze staan ook bekend onder de naam 'large intergenic non coding RNA (lincRNA). Grote niet coderende RNAs die tussen genen gelegen zijn. Een functie die ze lijken te hebben is die van 'air traffic controllers', luchtverkeersleiders. In het complexe systeem van een cel waarbij celonderdelen als vliegtuigen in de verschillende delen van de cel naar de startbaan taxiën, opstijgen, landen, bijgevuld, schoongemaakt worden, en passagiers aan boord nemen, zorgen de macroRNAs ervoor dat dit geheel ordelijk, veilig en op tijd gebeurt. De macroRNAs zijn de verkeersleiders in de commandotoren. Ze gebruiken hiervoor een nieuwe vorm van communicatie. Alsof je van analoog naar digitaal gaat, van fysiek naar draadloos en van Bill Gates naar Steve Jobs.

In onze zoektocht naar de genetische oorzaak van het HELLP syndroom zijn we op zo'n macroRNA gestuit. Het HELLP syndroom is een ernstige variant van pre-

eclampsie waarbij de zwangere vrouw hemolyse (bloedafbraak), leverschade (elevated liver enzymes) en stollingsstoornissen (low platelets) krijgt tijdens de zwangerschap. Ook deze afwijking onderzochten we met de overtuiging dat de oorzaak in de placenta ligt. Op een chromosoom, nummer 12, hebben we een macroRNA gevonden dat zeer groot is, geen enkel eiwit maakt, in de placenta gemaakt wordt en genetische afwijkingen bevat bij de patiënten met HELLP die bij gezonde mensen niet voorkomt. Het einde van dit niet-coderend RNA overlapt voor een klein deel met een RNA dat wel een eiwit maakt, IGF1, een groeifactor. Ook voor deze zoektocht gold, er is een hoop gesequenced. Ook deze belofte aan de HELLP patiënten die hun DNA en dat van hun kinderen hebben afgestaan voor dit onderzoek hopen we snel te kunnen inlossen.

MicroRNA

Een andere klasse van niet-coderend RNA betreft de zogenaamde microRNA's, zo genoemd omdat ze zo klein zijn, slechts 20-25 nucleotiden. Van deze klasse is wel bekend hoe hun werking is. Als een soort dimschakelaar regelen ze in een cel de hoeveelheid eiwit. Elk microRNA kan verschillende eiwitten reguleren, elk eiwit kan door verschillende microRNAs gereguleerd worden. Mogelijkheden voor combinaties te over. Elke cel heeft daardoor een unieke barcode bepaald door de hoeveelheid van en combinatie aan verschillende microRNAs. 'Kan je die dan niet allemaal gelijk bepalen in specifieke cellen of bij bepaalde ziektes zodat je weet of een set van microRNAs voorspellend of inzichtelijk is voor deze ziektes?' Dat is exact wat we nu aan het testen zijn: in ruggemergvloeistof van patiënten met dementie in samenwerking met het Alzheimer centrum (Argonde van Harten, Philip Scheltens en Wiesje van der Flier), in hartspiercellen bij patiënten die lijden aan een genetische vorm van hartfalen in samenwerking met de afdeling Fysiologie (Diederik Kuster en Jolanda van der Velden), in hartweefsel bij muizen met een myocard infarct in samenwerking met de afdeling Fysiologie (Rob Janssen, Dop Simonides). Uitbreiding van deze aanpak (bepaal in zijn geheel de expressie van alle RNAs, inclusief de niet-coderende) met de techniek (MPS) die zo succesvol was voor de diagnostiek van het syndroom van Down, gaat de komende jaren nieuwe inzichten geven, bestaande technieken vervangen, en nieuwe aanknopingspunten geven voor preventie en therapie van tot nu toe onbegrepen aandoeningen. Een eerste toepassing verwacht ik bij groeivertraging van het kind tijdens de zwangerschap. De consequenties kunnen nog verder gaan. Men begint steeds meer bewijs te vinden voor de aanname dat deze RNA moleculen hoewel ze dus geen eiwit maken een boodschap functie hebben waarbij ze uitgewisseld worden tussen cellen. Een nieuwe laag van intercellulaire communicatie. In de zwangerschap zou dat betekenen dat de mogelijkheid bestaat dat RNA van het kind een boodschap afgeeft aan de moeder.

Epigenoom

Naast de macro- en microRNA's is er nog een derde laag aan biologische informatie in ons erfelijk materiaal. Ook de informatie in deze laag is onafhankelijk van eiwitten. U begrijpt, ik zou mijn geld voor toekomstig onderzoek niet inzetten op eiwitten. Ook deze informatielaag is met moderne middelen in zijn geheel te bepalen op een hypothese-vrije manier en tegen een redelijke prijs. Het betreft het epigenoom, zo genoemd omdat het een modificatie

van het genoom betreft dat er bovenop ligt, er bovenop komt (epi). Waarom is deze laag zo belangrijk? Een duidelijk antwoord hierop kwam uit het onderzoek van identieke tweelingen. Het DNA van een-eiige tweelingen is identiek. Toch ontwikkelen ze vaak als ze ouder worden verschillende ziektes of persoonlijkheden. Het antwoord ligt in het epigenoom. Het epigenoom bestaat uit natuurlijk voorkomende chemische modificaties in ons DNA terwijl er in de DNA sequentie zelf geen verschil zit en geen veranderingen zijn opgetreden. De epigenetische modificaties werken als een gas- of rempedaal voor genen en sturen daarmee biologische processen. Identieke tweelingen hebben dezelfde set van epigenetische markers bij de geboorte. Naarmate ze ouder worden kunnen deze epigenetische markers verloren gaan bijvoorbeeld willekeurig door het proces van veroudering maar ook versneld door bijvoorbeeld schadelijke invloeden vanuit het milieu zoals roken. Het gevolg: door een herschikking van het epigenoom ontwikkelen de identieke tweelingen verschillende ziektebeelden zonder dat er sprake is van een verandering in de DNA sequentie zelf. Dit fenomeen is ook van belang voor het inzicht dat sommige vrouwen met pre-eclampsie hart-en vaatziekten ontwikkelen na een gecompliceerde zwangerschap. Welke vrouwen wel of niet dit risico lopen is geheel onbekend. Hetzelfde geldt voor de kinderen met een laag geboortegewicht geboren uit een gecompliceerde zwangerschap. Een aantal van hen ontwikkelt het zogenaamde metabool syndroom met suikerziekte, hoge bloeddruk, verhoogd cholesterol en overgewicht. Voor beide aandoeningen geldt dat de oplossing in het epigenoom gezocht dient te worden. Mijn boodschap: combineer de technologie die we nu in het lab hebben met de klinische inzichten en daaraan verbonden onderzoekers in het VU Medisch Centrum en onderzoek de verschillen in het epigenoom bij discordante tweelingzussen en de kinderen geboren uit gecompliceerde zwangerschappen. De gevonden markers zullen voorspellend zijn voor hart- en vaatziekten.

De vroege ontwikkeling bepaalt ons latere leven.

Ik heb gezegd!

Literatuur

1. van Wijk IJ, van Vugt JM, Mulders MA, Könst AA, Weima SM, Oudejans CBM. 1996. Enrichment of fetal trophoblast cells from the maternal peripheral blood followed by detection of fetal deoxyribonucleic acid with a nested X/Y polymerase chain reaction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174: 871-878.
2. van Wijk IJ, Griffioen S, Tjoa ML, Mulders MAM, van Vugt JMG, Loke YW, Oudejans CBM. 2001. HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. *Am. J. Obstet. Gyn.* 184: 991-997.
3. Leegwater PAJ, Vermeulen G, Könst AAM, Naidu S, Mulders J, Visser A, Kersbergen P, Mobach D, Fonds D, van Berkel C, Lemmers R, Frants RR, Oudejans CBM, Schutgens RBH, Pronk JC, vd Knaap MS. 2001. Subunits of the translation

initiation factor *eIF2B* are mutated in leukoencephalopathy with vanishing white matter. *Nat. Genet.* 29: 383-388.

4. Oudejans CBM, Go ATJJ, Visser A, Mulders M, Westerman BA, Blankenstein MA, van Vugt JMG. 2003. Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma. *Clin. Chem.* 49: 1445-1449.

5. Oudejans CBM, Mulders J, Lachmeijer AMA, van Dijk, M, Könst A, Westerman BA, van Wijk IJ, Leegwater PAJ, Kato H, Matsuda T, Kato N, Dekker GA, Pals G, ten Kate LP, Blankenstein MA. 2004. The parent-of-origin effect of 10q22 in preeclamptic females coincides with two regions clustered for genes with downregulated expression in androgenetic placentas. *Mol. Hum. Reprod.* 10: 589-598.

6. Chim SS, Tong YK, Chin RWK, Lau TK, Leung TN, Chan LYS, Oudejans CBM, Ding C, Lo YM. 2005. Detection of placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 14753-14758.

7. van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Könst AAM, Lachmeijer AMA, Dekker GA, Blankenstein MA, Oudejans CBM. 2005. Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a novel member of the winged helix gene family. *Nat. Genet.* 37: 514-519.

8. van Dijk M, van Bezu J, Poutsma A, Veerhuis R, Rozemuller AJM, Scheper W, Blankenstein MA, Oudejans CBM. 2010. The pre-eclampsia susceptibility gene *STOX1* controls a conserved pathway shared between placenta and brain with overexpression in late-onset Alzheimer disease. *J. Alzheimers Dis.* 19: 673-679.

9. van Dijk M, van Bezu J, van Abel D, Dunk C, Blankenstein MA, Oudejans CBM, Lye SJ. 2010. The *STOX1* genotype associated with pre-eclampsia leads to a reduction of trophoblast invasion by α T-catenin upregulation. *Hum. Mol. Genet* 19: 2658-2667.

10. Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YWL, Leung TW, Sun H, Chan A, Lun FMF, Go ATJI, Lau E, To W, Leung WC, Tang R, Au-Yeung S, Lam, H, Kung YY, Zang, X, van Vugt JMG, Minekawa R, Tang M, Wang J, Oudejans CBM, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YMD. 2011. Noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing. *Brit. Med. J.* 342: c7401.

