

Over Leven en Technologie

Prof.dr. J.G. Kuenen

Hoogleraar algemene en toegepaste microbiologie,
Faculteit Technische Natuurwetenschappen

Inleiding

De kranten staan er vol van. De Scientific American wijdt er bijna iedere week een artikel aan. Het bedrijfsleven gooit het roer om. En de minister van Economische Zaken Jorritsma heeft een "baby" : Life Sciences. Een liefdesbaby zelfs, zoals uit het Chemisch Weekblad van 10 april 1999 blijkt (1). De groei zit er in, zeker in het nieuwe millennium als we Tabel 1 mogen geloven (geciteerd uit (1)). Technologische doorbraken, gecombineerd met ondernemerschap moeten er voor zorgen dat ook Nederland een grote sprong voorwaarts maakt op dit terrein.

sector	% biotech in omzet in 1996	% biotech in omzet in 2000	% biotech in omzet in 2010
farma	9	20	34
agri-business	2	7	20
food en feed	3	10	30
chemie	13	18	27
milieu	9	15	18

bron: biotechnologie op weg naar het jaar 200; uitgave van EZ, 1996

Tabel 1. Groeipotentie. Aandeel van biotechnologie-gerelateerde producten in de omzet van de sectoren farma, agri-business, voedsel en veevoeder, chemie en milieu.

Vanwaar de enorme en verhoogde belangstelling voor dit gebied, dat tot nu toe bekend staat als de "biotechnologie"?

Dat komt door een lawine van wetenschappelijke doorbraken, die de kennis over de basis van het leven - de *Levende Cel* - op een duizelingwekkende wijze vergroot en verbreedt.

De complete DNA-volgorde van het menselijk erfelijk materiaal, het zogenaamde "genoom" en ook dat van vele andere levende organismen, van bacterie tot giraf, is reeds, of komt binnen een paar

jaar, beschikbaar. Begin december van het afgelopen jaar zijn de 33 miljoen codeletters van het DNA in het op één na kleinste chromosoom van de mens, chromosoom 22, gepubliceerd. De grote uitdaging is nu om uit te vinden hoe de moleculaire Blauwdruk (het DNA-“instructieboek”) van het leven wordt vertaald in functionele macromoleculen (zoals eiwitten), in levende cellen en complete organismen.

De dichtheid van informatie, zoals die in het DNA voorkomt en ook aanwezig is in de door het DNA gecodeerde macromoleculen, is zo groot dat de moleculair-biologen (die de volgorde van het DNA in eerste instantie hebben opgehelderd) nu, meer dan ooit, de hulp moeten inroepen van een scala aan andere disciplines zoals chemie, fysiologie, proces- en produkt-technologie, wiskunde, informatica, micro-elektronica en zelfs nanotechnologie. Alleen met de hulp van dit scala aan disciplines zal het mogelijk zijn het detail, de diversiteit en de immense hoeveelheid van informatie te bestuderen, te verwerken, te interpreteren en ook toe te passen. Dat hele brede gebied van disciplines noemt men, in goed Nederlands, “Life Science & Technology”.

Nieuwe combinaties van fundamentele research zullen nu trachten vanaf het *moleculaire niveau* vragen te beantwoorden, bijvoorbeeld over hoe cellen differentiëren, hoe ons immuun-systeem werkt en hoe de groei van een cel gecontroleerd wordt. Zeer gedetailleerde kennis van groei en productvorming door de cel zal kunnen leiden tot nieuwe concepten in biologische productiemethoden, diagnose, medische behandeling van bijvoorbeeld kanker en veroudering, en farmacie.

Life Science & Technology heeft tot doel het begrijpen, het nauwkeurig voorspellen, het beheersen en het exploiteren van de mogelijkheden die de Natuur biedt ten bate van een gezonde, duurzame en kwalitatief hoogwaardige samenleving. In die zin gaat het om onderzoek en technologie van leven en levensprocessen die ons de mogelijkheden bieden om optimaal te *overleven*. Dat is dan ook de grote uitdaging van het nieuwe millennium.

Het is interessant stil te staan bij het feit dat vlak voor de vorige eeuwwisseling net zo'n type revolutie voor de deur stond. Men had toen de relatie tussen ziekte en bacteriën gelegd en in 1895 werd in de Delftse Scheikunde Faculteit de hoogleraar Martinus W. Beijerinck aangesteld. (Fig. 1)

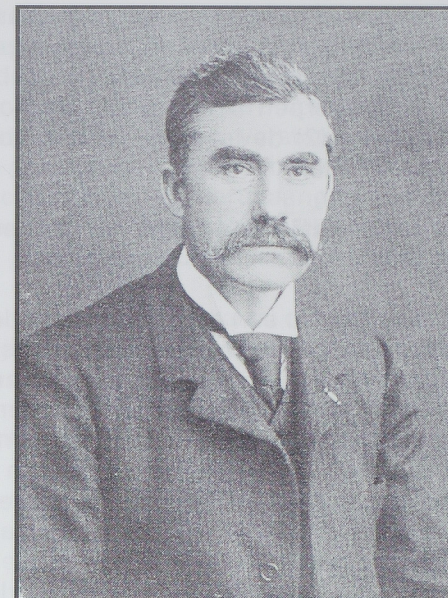


Fig. 1. Martinus W. Beijerinck, hoogleraar Algemene Bacteriologie TU Delft, 1895-1922.

Een algemeen microbioloog, één van de eerste in Europa die zich bezig ging houden met “nuttige micro-organismen”, zoals bakkersgisten. Toepassingen van micro-organismen, bacteriën, schimmels en gisten, hebben een enorme omwenteling in ons leven veroorzaakt: denkt u maar aan antibiotica, enzymen in wasmiddelen, hormonen, vitamines enzovoort. Het is dan ook niet verbazend, dat vele kleine en grote bedrijven thans actief zijn op het gebied van Life Science & Technology. In Nederland zijn dat bijvoorbeeld DSM (inclusief Gist), AKZO (Organon, Diosynth), Avebe, grote zaadbedrijven, Genencor, Mogen, Centocor, Pharming, milieubiotechnologiebedrijven zoals Paques en tenslotte, niet te vergeten, de enorme afvalwaterzuiveringsindustrie.

De Technische Universiteit Delft en de Universiteit Leiden hebben de krachten van drie Faculteiten gebundeld in een groot onderwijs en onderzoekprogramma Life Science & Technology. Dat lag voor de hand omdat Delft en Leiden een lange traditie hebben in de samenwerking op het gebied van de Biotechnologie, in de Onderzoeksschool BSDL.

In de rest van mijn rede wil ik daar verder op ingaan en laten zien dat we met deze onderzoeks- en onderwijsplannen gereed zijn voor de nieuwe eeuw. Ik zal daarbij na een inleiding over bio-informatie-overdracht, drie onderwerpen behandelen, (1) hoge snelheids-screening en -diagnose, (2) de levende cel als fabriek en (3) de exploitatie van biodiversiteit.

Overdracht van informatie door onderlinge herkenning van bio-moleculen

Het eerste onderwerp dat nu aan de orde komt is de vraag hoe in de levende cel informatie (en in bredere zin: "kennis") wordt doorgegeven. Dit gebeurt op moleculaire schaal grotendeels op basis van *herkenning* van het ene molecuul door het andere. Je kunt zeggen dat die herkenning geschiedt doordat de atomen en moleculen van twee verschillende verbindingen elkaar kunnen aantrekken en bovendien op elkaar passen zoals een sleutel op een slot. Verbindingen "klikken" als het ware als magneetjes in elkaar. Onderlinge herkenning van bio-moleculen is een fundamentele basis voor informatie-overdracht in biologische systemen, in allerlei vormen. Het principe is al jaren bekend, maar de reikwijdte daarvan is pas sinds kort in zijn volle omvang doorgedrongen.

Een voorbeeld van de moleculaire herkenning is gegeven in Fig. 2.

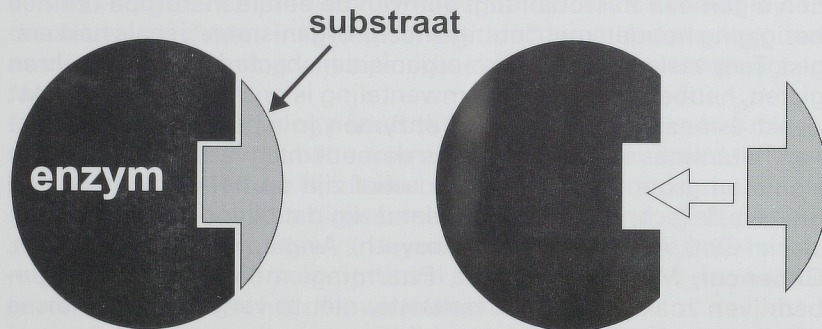


Fig. 2. Herkenning van substraat door enzym. Het substraat past als het ware in het veel grotere eiwit-molecuul. De herkenning is gebaseerd op moleculaire en atomaire interacties.

Het enzym is schematisch als een bolletje met een uitsparing getekend. In die uitsparing past het substraat, dat wil zeggen het molecuul dat het enzym moet binden en omzetten. De meeste enzymen zijn zeer specifiek, d.w.z. ze "herkennen" alleen het molecuul, dat ze moeten omzetten. Ook de werking van antilichamen in ons

bloed bij het onschadelijk maken van bijvoorbeeld virussen berust op herkenning. Zeer belangrijk is dat herkenning van moleculen ook een principe is, waarmee de cel zijn zaakjes intern regelt en bovendien communiceert met de buitenwereld. Daarbij kunnen signalen, na herkenning, worden versterkt en kunnen acties in werking worden gezet, waarmee bijvoorbeeld de celgroei wordt bevorderd, of een complete spier wordt aangetrokken. Bepaalde vlinders hebben letterlijk maar één molecuul van een lokstof nodig om te besluiten de partner van hun keuze achterna te gaan!

Herkenning vormt vanzelfsprekend ook de basis waarop informatie van het erfelijk niveau wordt doorgegeven, zoals in Fig. 3 is geschetst.

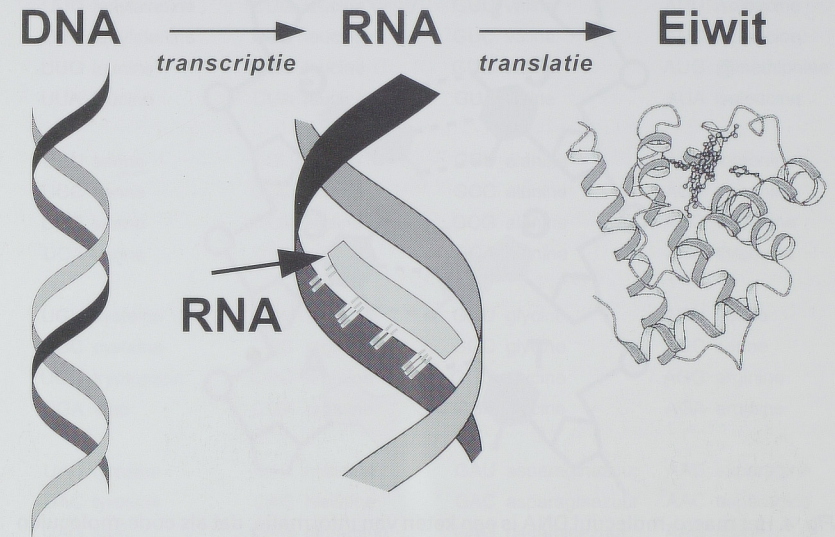


Fig. 3. Het DNA is een keten van vele duizenden genen, die ieder coderen voor een eiwit. Een gen wordt overgeschreven als RNA. Het RNA wordt daarna vertaald in een eiwit. De tripletcode (tabel 2) zorgt voor een eenduidige codering van een van de 20 aminozuren, die als bouwstenen voor de eiwitten worden gebruikt.

DNA is een keten van informatie, die bestaat uit een groot aantal modules, de zogenaamde genen. De meeste genen bevatten de code voor één eiwit, dat wil zeggen een keten van aminozuren. Een gen kan worden overgeschreven in RNA, dat vervolgens zijn informatie weer doorgeeft aan de machinerie in de cel die daar het betreffende eiwit van kan maken. Eiwitten zijn zeer belangrijke onderdelen van de cel. Eiwitten kunnen signalen opvangen en doorgeven. Contractiele eiwitten spelen een essentiële rol in de spierfunctie. Andere eiwitten hebben een functie als enzym. Enzymen zijn ver-

antwoordelijk voor het omzetten van de grondstoffen, zoals glucose in de levende cel, via allerlei stofwisselingsroutes. Enzymen zijn ook verantwoordelijk voor de kopiëring van DNA en voor het vertalen van de RNA in eiwit.

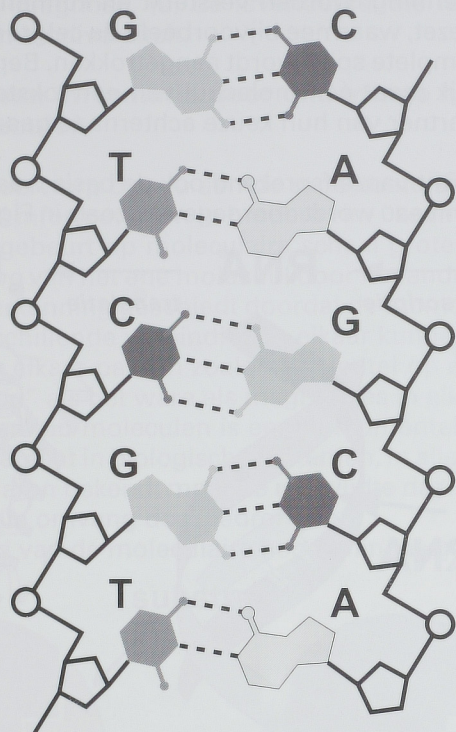


Fig. 4. Het macro-molecuul DNA is een keten van informatie, dat als code-moleculen de z.g. bases G,C,T en A bevat (G = Guanine; C =Cytosine; T =Thymine; A =Adenine). De paring van de bases G en C, respectievelijk A en T staat aangegeven als stippellijntjes. De meeste DNA-moleculen bevatten honderdduizenden codeletters op een rij. De figuur hier toont slechts 5 aaneengeschaalde codeletters met de daarop passende anti-streng.

Het macro-molecuul DNA is een keten van informatie, die als code-moleculen de zogenaamde bases G,C,T en A bevat (Fig. 4). G kan C herkennen, en vice versa, en T kan A herkennen; en vice versa. Deze herkenning wordt ook wel de "base-paring" genoemd. Als een gegeven volgorde in het DNA moet worden gekopiëerd, kan de cel met behulp van een enzym een antikopie maken, waarin dezelfde informatie zit, weliswaar in een soort spiegelbeeld. We kunnen die kopieën tegenwoordig ook heel goed in de reageerbuis maken.

Enzymen kunnen op commando van de cel kleine stukjes kopiëren (overschrijven, ook transcriptie genoemd) van het DNA dat dan als RNA verder werkt. Het RNA-stukje dient als matrijs voor het maken van eiwit in het proces van vertaling, de translatie. Dat kan omdat de code-moleculen, steeds in setjes van drie, de zgn. tripletcode, kunnen coderen voor één van de twintig aminozuren, die de cel nodig heeft voor het bouwen van eiwit. Tabel 2 toont de triplet-codes zoals die in RNA worden gebruikt. Aldus is een betrouwbaar doorgeefstelsel gemaakt van overschrijven en vertalen van de erfelijke informatie (zie ook Fig. 3).

codon	aminozuur	codon	aminozuur	codon	aminozuur	codon	aminozuur
UUU	fenylalanine	CUU	leucine	GUU	valine	AUU	isoleucine
UUC	fenylalanine	CUC	leucine	GUC	valine	AUC	isoleucine
UUG	leucine	CUG	leucine	GUG	valine	AUG	@methionine
UUA	leucine	CUA	leucine	GUA	valine	AUA	isoleucine
UCU	serine	CCU	proline	GCU	alanine	ACU	threonine
UCC	serine	CCC	proline	GCC	alanine	ACC	threonine
UCG	serine	CCG	proline	GCG	alanine	ACG	threonine
UCA	serine	CCA	proline	GCA	alanine	ACA	threonine
UGU	cysteine	CGU	arginine	GGU	glycine	AGU	serine
UGC	cysteine	CGC	arginine	GGC	glycine	AGC	serine
UGG	tryptopaan	CGG	arginine	GGG	glycine	AGG	arginine
UGA	stop	CGA	arginine	GGA	glycine	AGA	arginine
UAU	tyrosine	CAU	histidine	GAU	asparaginezuur	AAU	asparagine
UAC	tyrosine	CAC	histidine	GAC	asparaginezuur	AAC	asparagine
UAG	stop	CAG	glutamine	GAG	glutaminezuur	AAG	lysine
UAA	stop	CAA	glutamine	GAA	glutaminezuur	AAA	lysine

Tabel 2. De genetische triplet-code ("codon") voor de 20 verschillende aminozuren, zoals die in RNA wordt gebruikt. N.B. in wordt U (Uracil) gebruikt in plaats van T, zoals dat in DNA aanwezig is.

Het is belangrijk te melden dat we tegenwoordig de kopieën van DNA en RNA ook in de reageerbuis kunnen maken. Simpel gezegd gebeurt dat met "kopieer"-enzymen, die men tegenwoordig gewoon in de handel kan krijgen. Als men nu een stukje DNA in de cel wil vervangen, dan gebruikt men in het laboratorium ook nog "knip-en plak"-enzymen. Daarmee opent men eerst de DNA-streng en vervolgens plakt men er een nieuw stukje in. Dat is de *recombinant-DNA-techniek*. Het kopie-DNA wordt meestal vermenigvuldigd door

het in kleine, hanteerbare stukjes in een bacterie te brengen, die deze stukjes DNA dan vermenigvuldigt met zijn eigen enzymen. Zo'n bacterie-cel, die is voorzien van een specifiek stukje DNA, kan men zich laten vermenigvuldigen, waarbij een "kolonie" op een agarplaat ontstaat. Zo'n kolonie afkomstig van één enkele bacterie, en voorzien van een door ons geselecteerd stukje DNA noemt men een "kloon". Dat is dus een genetisch veranderde bacterie. Vandaar ook de naam *kloneringstechniek*. Als we de bacteriecultuur daarna weer oogsten, kunnen we een grotere hoeveelheid van het gewenste DNA in handen krijgen. Via tamelijk eenvoudige laboratorium-procedures kan men het verkregen DNA daarna eventueel ook overbrengen in bijvoorbeeld een gist of een plantencel, die daarbij op zijn beurt een genetische verandering ondergaat. Van zo'n cel maakt men dan ook weer klonen om het genetisch gemodificeerde materiaal in de gewenste hoeveelheden in handen te krijgen.

Hierboven is vastgesteld dat de cel een goed informatie-doorgeefstelsel heeft. Maar, dat is gemakkelijker gezegd dan gedaan, want als we nu bedenken dat het menselijk DNA ongeveer honderdduizend genen bezit, met totaal 3 miljard code-letters, hoe organiseert de cel die zee van informatie? Dat moet goed gebeuren, want we weten namelijk dat op ieder moment hooguit een paar procent wordt overgeschreven. Dit geeft toch al een cel met daarin een paar duizend verschillende eiwitten, die natuurlijk in concert met elkaar moeten samenspelen. Van sommige zijn maar één per cel, van andere een paar honderd. Er moeten dus zeer ingewikkelde regelmechanismen ter beschikking staan.

Hoge snelheids-screening en -diagnose

Als wij de complexiteit van het informatie-doorgeefstelsel van de levende cel willen begrijpen is de vraag natuurlijk hoe ons onderzoek deze veelheid van gegevens en informatie kan aanpakken. Daarvoor hebben we supergevoelige en, gezien de astronomische getallen, ook supersnelle methodes nodig die de informatie kunnen *herkennen* en dat met een nauwkeurigheid van één specifiek eiwitmolecuul per cel. Daarbij maken we gebruik van robots, laserapparaten, de meest geavanceerde microscopen, enzovoort. We moeten miniaturiseren want we hebben meestal maar hele kleine hoeveelheden materiaal waarin die metingen moeten worden gedaan. Dus maken we micro-"biochips", waarmee men razendsnel duizende metingen kan verrichten. En tenslotte, teneinde de veelheid van informatie te verwerken moeten we ook gebruik maken van mathematische modellen, (bio)informatica en statistiek en intelligente computerprogramma's om die veelheid aan gegevens en

informatie te interpreteren. Het lijkt te veel om aan te pakken maar de wetenschap is hard op weg om dit op te lossen. De bijzondere combinatie van expertise in Delft en Leiden kan daaraan een belangrijke bijdrage leveren.

In een getoond filmpje *) gaat het om het detecteren van specifieke eiwitten in bijvoorbeeld bloed. Men doet dat op een "bio-chip". Men spreekt van een biochip omdat het hier gaat om een klein plaatje van een paar vierkante millimeter, dat dicht bezet is met biomoleculen, en dus ook dicht bezet is met informatie. Vandaar dus de naam "chip". Op zo'n biochip, die vaak het glanzend uiterlijk van een compact disk (CD) heeft, worden druppeltjes van een paar nanoliter (nano is 10^{-9}) door middel van een robot in een vast patroon vastgezet. Die druppeltjes bevatten bio-herkenningsmoleculen, die als 'receptor'-molecuul andere moleculen kunnen herkennen. Men gebruikt als receptormoleculen bijvoorbeeld antilichamen, die specifiek met een eiwit kunnen binden. Als we de chip nu in contact brengen met het bloed, waarin we allerlei stoffen willen meten, dan herkennen de receptoren (de antilichamen) op de biochip de specifieke bloed-eiwit-moleculen, die daarop vast "klikken". De kunst is nu te detecteren wáár op die chip die moleculen specifiek zitten vastgeklikt. Collega Schalkhammer maakt daarvoor gebruik van "moleculaire versterkers", zgn. nano-clusters. Nanoclusters zijn kleine metaal-deeltjes van nano-afmetingen (een miljoenste mm). De nanoclusters worden chemisch gekoppeld aan de eiwit-moleculen in het bloed. Op die plaatsen, waar het bloedeiwit aan een antilichaam is gaan zitten, komen de metaaldeeltjes vlak bij het oppervlak van de chip te zitten. Fig. 5 geeft een beeld van de positie van de nanoclusters ten opzichte van de spiegel, met daartussen de eiwitten die elkaar hebben "herkend".

*) Tijdens de rede is de inzet van nieuwe combinaties van expertise getoond in een filmpje, dat in september 1999 door de Oostenrijkse TV (ORF) is opgenomen over het werk van collega Thomas Schalkhammer, die in onze Afdeling Biotechnologie samen met de fysici prachtige nieuwe en snelle analyse-methoden ontwikkelt. Om een specifiek biomolecuul te detecteren maakt hij steeds gebruik van het principe, dat biomoleculen elkaar kunnen herkennen. We kunnen bijvoorbeeld allemaal stukjes DNA op een bio-chip zetten en daarmee stukjes RNA in de levende cel identificeren. Bio-chips kunnen ook worden voorzien van antilichamen. Dat zijn eiwitten die specifiek andere eiwitten kunnen herkennen.

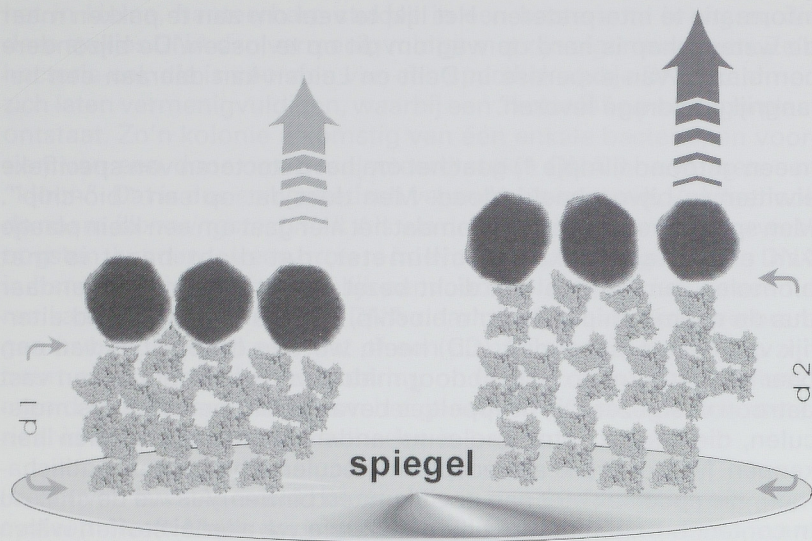


Fig. 5. Schematische voorstelling van de herkenning van eiwitten op een "bio-chip", die zichtbaar wordt gemaakt d.m.v. z.g. nano-metaal-clusters (diameter ongeveer 10 nm). Voor uitleg zie tekst.

Hoe beter de herkenning, des te dichter komt het nanocluster bij het oppervlak van de chip. Het oppervlak van de chip bevat een ragdun zilver- of goudlaagje, vergelijkbaar met een CD. Als men het oppervlak belicht, dan krijgt men op die plaatsen waar de nanoclusters zitten een kleur (aangegeven met een verticale pijl boven de nanoclusters). De kleur is afhankelijk van de afstand die het metaaldeeltje heeft tot het dunne goudlaagje.

In Fig. 6 is te zien wat de afleesrobot te zien krijgt: honderden minuscule stipjes, met verschillende kleurintensiteit (= verschillende grijs tinten in Fig. 6). De gevoeligheid van deze methode is ontzettend groot; met de huidige technieken kunnen reeds de interactie van vijf eiwitmoleculen met de antilichamen op de stip worden gedetecteerd.

De afleesrobot moet nu al die kleurstipjes meten. In één minuut kunnen 10.000 puntjes worden gemeten. De informatie wordt dan in een computer/scanner gevoerd en de gegevens kunnen dan worden afgelezen, omdat men van ieder plekje op de chip weet welk stofje uit het bloed daar bindt. Dit is dus de hoge snelheids-screening, die in engels jargon "high-speed screening" (HSS) of "highthroughputscreening (HTS)" wordt genoemd. Hiermee is men dus in

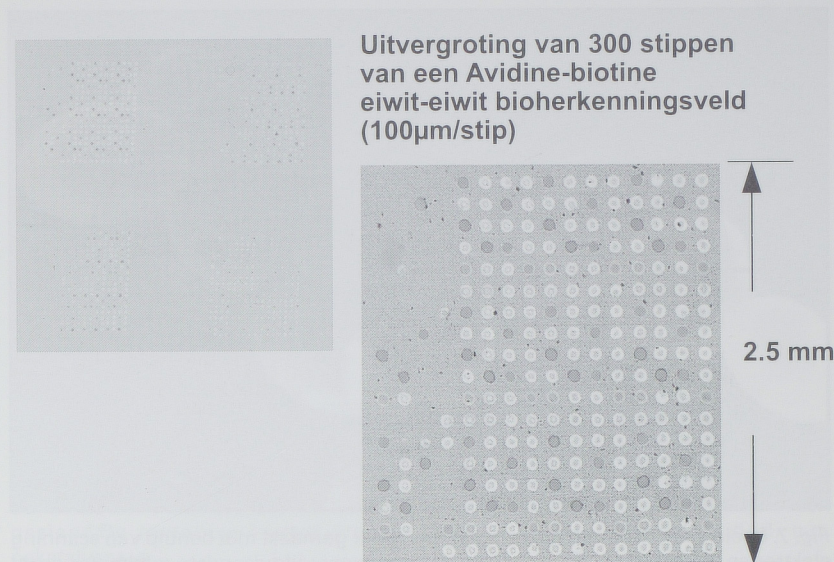


Fig. 6. Microstippen op de eiwit-cluster-chip (zie Fig. 5). Links ziet men een complete chip met daarop totaal ongeveer 1200 stipjes met verschillende eiwitten. Een uitvergroting van een kwart-gedeelte is rechts te zien. Merk op dat de verschillende grijs tinten (die in werkelijkheid verschillende kleuren hebben) direct het gevolg zijn van de interactie tussen de eiwitten, zoals die zichtbaar wordt door de nanoclusters.

staat om uit de enorme veelheid van gegevens in de levende wereld in een oogwenk zeer veel bruikbare informatie te vergaren, bijvoorbeeld ten behoeve van het in kaart brengen van de genen, voor diagnose van ziektes, voor de klinische chemie. Een heel andere toepassing die wij op het lab op het oog hebben is het besturen van biotechnologische processen op grond van de snelle analyses die we met die chips kunnen doen.

De levende cel als fabriek

Het tweede onderwerp dat ik kort wil bespreken is het gebruik van levende gistcellen als "fabriek" voor de productie van nuttige verbindingen. Mijn collega's Van Dijken, Steensma en Pronk doen dat met behulp van bakkersgist, waarvan in Fig. 7 een elektronenmicroscopische opname is te zien.

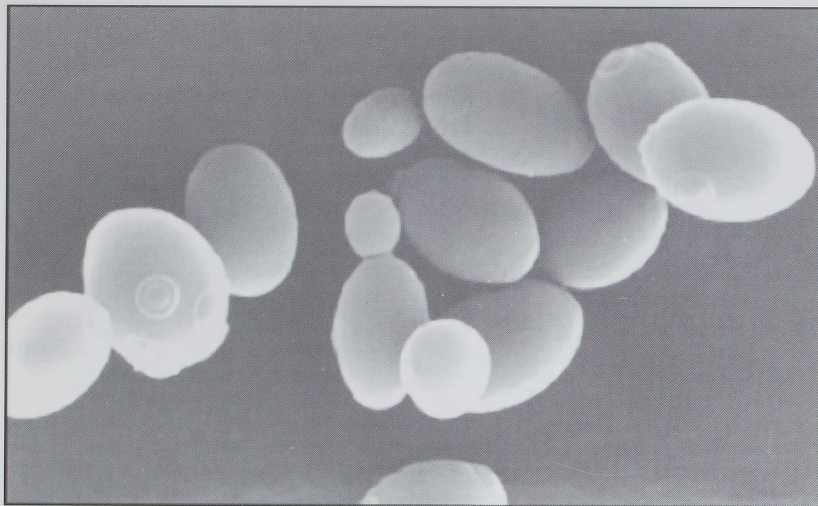


Fig. 7. Beeld van cellen van bakkersgist, zichtbaar gemaakt met behulp van scanning elektronen microscopie. De gistcellen zijn ongeveer vijfduizendste millimeter groot en vermenigvuldigen zich door knopvorming.

Zoals u wellicht weet, worden gisten onder andere gebruikt voor bereiding van brood, wijn en bier. De oude Egyptenaren pasten reeds gisten toe om bier te brouwen. Zij kunnen dus met recht "biotechnologen avant la lettre" genoemd worden. Gistcellen kunnen ook worden toegepast voor productie van een grote verscheidenheid van andere nuttige producten, zoals smaakstoffen, gistextract en soepingrediënten. Dit idee is niet nieuw: Beijerinck hield zich, zoals gezegd, al honderd jaar geleden bezig met de productie van allerlei nuttige verbindingen door micro-organismen. Het belangrijkste verschil is dat we tegenwoordig de levende cel niet meer als een onbegrepen "black box" hoeven te beschouwen, maar thans in staat zijn met een breed scala van geavanceerde technieken, deze "black box" te openen. Vervolgens kunnen we met behulp van genetische technieken ingrijpen in de processen die ten grondslag liggen aan productvorming en die daarmee veranderen en verbeteren.

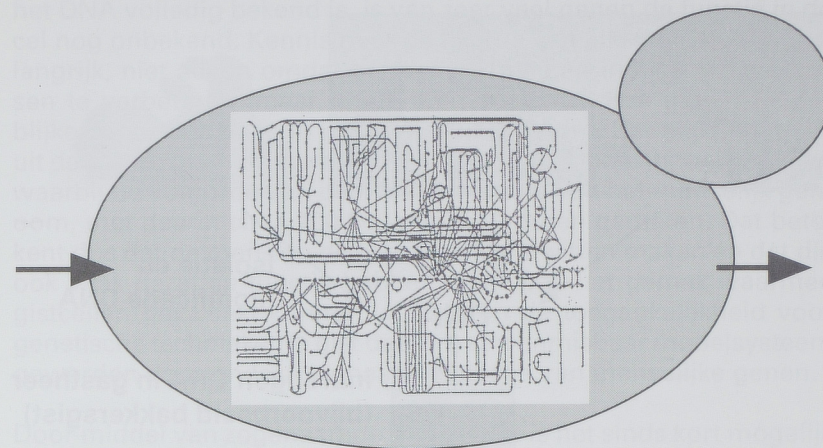


Fig. 8. Schematische voorstelling van de gistcel als "chemische fabriek", met daarin de metabole routes die als de "lopende banden" van een fabriek kunnen worden gezien. De metabole routes worden door enzymen bewerkstelligd, c.q. gekatalyseerd.

In Fig. 8 ziet u een schematische en sterk vereenvoudigde weergave van de gistcel als chemische fabriek. In de gistcel bevindt zich een groot aantal chemische syntheseroutes, die tezamen eenvoudige grondstoffen als suikers en zouten kunnen omzetten in celbestanddelen en producten. In analogie met een fabriek zouden deze chemische syntheseroutes de "lopende banden" van de celfabriek genoemd kunnen worden. De chemische reacties die tezamen dit gecompliceerde netwerk vormen, worden alle mogelijk gemaakt door de aanwezigheid van specifieke enzymen.

De blauwdruk voor de celfabriek ligt opgeslagen in het DNA. Omdat de vertaling van de DNA-volgorde naar de aminozuurvolgorde in enzymen en andere eiwitten universeel is voor alle levende organismen, kunnen we DNA uit willekeurig welk ander levend organisme inbrengen in de gistcel en daar laten aflezen (Fig. 9).

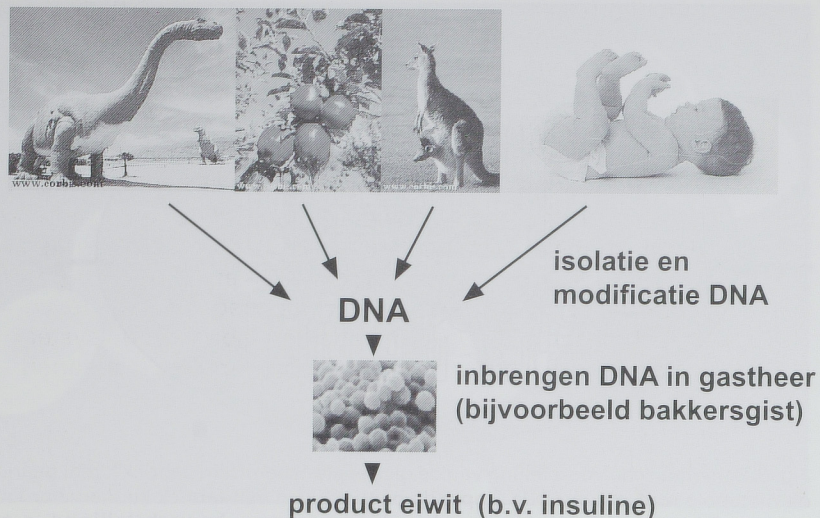


Fig. 9. Recombinant-DNA-technologie maakt het mogelijk om stukken DNA van het ene levende wezen in het andere over te brengen. Aangezien de code "universeel" is, leest een gistcel dezelfde codes af en maakt dan ook een eiwit af dat identiek is aan het oorspronkelijke eiwit.

Op deze wijze kan de gistcel aangezet worden tot productie van soortvreemde eiwitten. Deze "recombinant-DNA" technologie heeft in de afgelopen decennia een grote vlucht genomen. Het toepassen van deze technologie voor de productie van farmaceutische eiwitten heeft in veel gevallen het gebruik van donormateriaal overbodig gemaakt. Dit is vooral belangrijk in die gevallen waarbij donormateriaal beperkt beschikbaar is en/of een risico oplevert voor besmetting met fatale ziekteverwekkers. Belangrijke farmaceutische eiwitten zoals menselijk groeihormoon en insuline worden tegenwoordig vrijwel uitsluitend via recombinant-DNA technieken geproduceerd.

Op het Kluyverlaboratorium onderzoeken we hoe we gistcellen optimaal kunnen inzetten als celfabriek. Een zeer belangrijke bron van informatie en inspiratie hierbij is het feit dat in 1997 de complete DNA-volgorde van het gistgenoom is opgehelderd. Aan dit mega-project hebben naast vele andere Europese groepen ook Delftse onderzoekers meegewerkt (2).

Het staat nu vast dat de bakkersgist, die de officiële naam *Saccharomyces cerevisiae* draagt, ruim 13 miljoen code-letters in het DNA heeft. Die letters coderen voor 6300 genen, die op hun beurt voor even zo vele eiwitten coderen. Hoewel de volgorde van

het DNA volledig bekend is, is van zeer veel genen de functie in de cel nog onbekend. Kennis over de functie van alle gistgenen is belangrijk, niet alleen omdat het ons kan helpen industriële processen te verbeteren, maar ook omdat veel van deze genen tevens blijken voor te komen in het menselijk genoom. Dat blijkt namelijk uit de eerder genoemde resultaten van het humane genoomproject, waarbij de volgorde van de 3 miljard letters van het menselijk genoom, met daarin circa 100.000 genen, worden gemeten. Dat betekent dus dat de mens en de gist dezelfde eiwitten maken en dat die ook vaak dezelfde functie hebben. Vanwege het gemak waarmee gistcellen gekweekt kunnen worden en de toegankelijkheid voor genetische technieken is gist daarom een onmisbaar modelsysteem geworden voor onderzoek naar de functie van menselijke genen.

Door middel van zogenaamde DNA-chips is het sinds kort mogelijk om, op ieder gewenst moment, vast te stellen welke van de 6300 genen in het gistgenoom worden afgelezen en in welke mate. Hierbij wordt weer gebruik gemaakt van het principe van moleculaire herkenning, dat ik eerder genoemd heb: kleine stukjes DNA die nauwkeurig op bepaalde plaatsen op de chips zijn aangebracht, gaan een interactie aan met het RNA dat van specifieke genen uit de gistcel wordt afgeschreven (in het in Fig. 3 aangegeven proces van transcriptie). Hoe meer van een bepaald RNA-molecuul in de cel wordt gemaakt, hoe sterker het DNA-stipje op de chip zal gaan oplichten. Daarmee kan dus kwantitatief worden vastgesteld hoe sterk een bepaald gen wordt getranscribeerd.

In Delft wordt deze DNA-chip technologie gecombineerd met het kweken van bakkersgist onder nauwkeurig gedefinieerde condities. Geavanceerde kweekapparatuur maakt het mogelijk om de gist onder constante condities te kweken, waarbij per experiment slechts een enkele omgevingsfactor wordt veranderd. Een voorbeeld van zo'n experiment is te zien in Fig. 10.

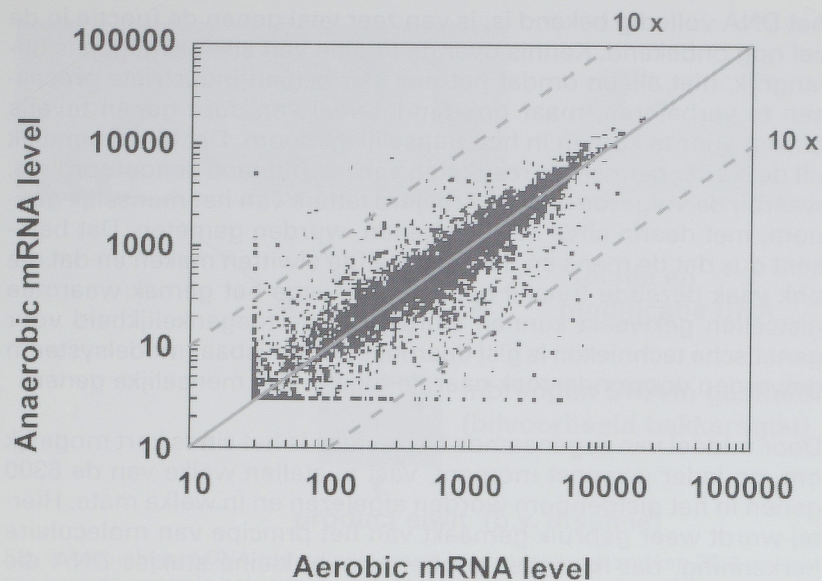


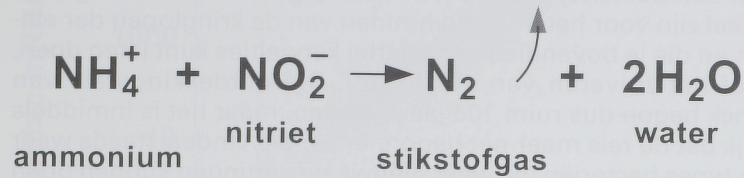
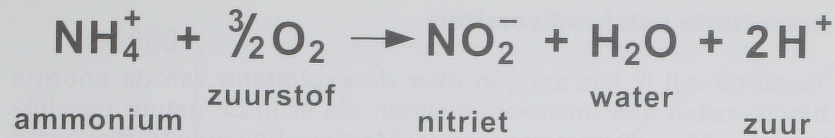
Fig. 10. Integrale analyse van het bakkersgist-genoom met DNA-chips.(3) Bakkersgist werd onder streng gecontroleerde condities gekweekt in aan- en afwezigheid van zuurstof. Daarna werd het totaal messenger-RNA geëxtraheerd en, na bewerking, gehybridiseerd met DNA-chips, die alle DNA uit de gist representeren. Iedere stip (behorend bij een bekend stukje uniek DNA uit een gen) is uitgezet als functie van de intensiteit van de DNA-RNA interactie in aan- en afwezigheid van zuurstof.

In dit experiment, uitgevoerd in samenwerking met onderzoekers van de Universiteit Leiden en de Stanford Medical School, zijn DNA-chips toegepast om te onderzoeken welke gist-genen specifiek in aanwezigheid, dan wel in afwezigheid van zuurstof worden afgelezen. Men ziet in de grafiek dat de meeste genen ongeveer op de getrokken lijn liggen, hetgeen betekent dat ze in aan- en afwezigheid van zuurstof ongeveer even sterk worden afgelezen. Slechts een klein deel van de genen vertonen een meer dan tienvoudig verschil in afleesniveau in aan- en afwezigheid van zuurstof. Dit houdt in dat een gistcel maar een zeer beperkt aantal van zijn zesduizend genen aan- of uitschakelt als hij van een zuurstofrijke omgeving overstapt naar een omgeving zonder zuurstof. Dit soort experimenten is bij uitstek geschikt om inzicht te verwerven in de rol van genen waarvan de functie thans nog onbekend is. Verder kunnen, door correlaties te leggen tussen productvorming en het afleesniveau van alle gistgenen, doelwitten worden geïdentificeerd voor genetisch ingrijpen in de gistcel met het doel de prestatie van de bakkersgist in industriële processen te verbeteren.

Exploitatie van biodiversiteit

Tenslotte wil ik iets zeggen over de exploitatie van de enorme biodiversiteit aan micro-organismen die er in de natuur beschikbaar zijn. Mijn illustere voorganger Martinus Beijerinck is met name beroemd geworden omdat hij ontdekte, dat de natuur een grote variëteit aan bacteriën en andere micro-organismen herbergt, die essentieel zijn voor het in stand houden van de kringlopen der elementen en die je bovendien van allerlei karweitjes kunt laten doen, inclusief het zuiveren van afvalwater. Die ontdekkingsreis van Beijerinck begon dus ruim 100 jaar geleden, maar het is inmiddels duidelijk dat de reis maar net begonnen is. We vinden steeds weer nieuwe types bacteriën die weer nieuwe omzettingen kunnen doen of interessante nieuwe stoffen kunnen maken, zoals antibiotica. Men zou kunnen zeggen dat we nog steeds maar het topje van de ijsberg zien: Dat blijkt ook uit het feit dat we, dankzij de moderne DNA-herkennings-technologie, nu in de grond, het water en de zee zien dat daar allerlei bacteriën actief zijn, die afwijkend en dus onbekend DNA bezitten. We schatten dat we pas 1% of minder van de bestaande micro-organismen kennen! Daar wacht dus een rijke bron van interessante informatie en mogelijkheden.

Op ons lab werken we aan bacteriën die kunnen worden ingezet voor de (industriële) afvalwaterzuivering, in het bijzonder de verwijdering van ammonium, dat als kunstmest wordt gebruikt en ook in heel veel afvalwaterstromen aanwezig is. In het huishouden staat ammonium bekend als het schoonmaakmiddel ammonia, maar afgezien van de zuurgraad is het stofje hetzelfde. Verwijderen van ammonium is een kostbaar proces, maar zeer recent hebben we een compleet nieuwe mogelijkheid ontdekt om veel goedkoper van de ammonium af te raken. Hoe dat chemisch gaat is in Tabel 3 te zien.



Tabel 3. Een eerste type van bacteriën zet de ammonium om in nitriet met behulp van zuurstof. Daarna wordt het nitriet samen met ammonium tot het onschuldige stikstof omgezet door een tweede type bacteriën in de afwezigheid van zuurstof.

Een noviteit is de laatste reactie, die door een nieuwe soort bacterie blijkt te worden uitgevoerd. De reden waarom de bacterie niet eerder ontdekt is ligt in het feit dat deze alleen in mengsels met andere bacteriën te kweken is en zeer langzaam groeit. De verdubbelingstijd is in de orde van 10 dagen. Als je met één cel begint moet je om een 100 gram materiaal te krijgen een jaar wachten. Dat schiet dus niet op, en onze promovendi hebben dan ook heel veel geduld moeten hebben! Het is uiteindelijk goed gelukt en op het laboratorium staat nu 15 liter kweekapparatuur, waarin per dag enkele grammen kunnen worden geproduceerd ten behoeve van het onderzoek. Nu we deze hoeveelheden eenmaal hebben kunnen we in een paar maanden vele kilo's maken. Een tweede probleem was dat we om meer te weten te komen over het proces en om de bacterie te kunnen identificeren een zogenaamde reïncultuur van dit micro-organisme nodig hebben. Dat is uiteindelijk met veel omwegen gelukt. De bacterie groeide in een mengsel, en was op het oog (met het microscoop) daar voor ongeveer 70 % van het totaal aanwezig. De cultuur is knalrood, omdat de bacterie waar het ons om gaat een rood ademhalingspigment bevat. We hebben het organisme toen via centrifugatie-truukjes gezuiverd en dankzij de rode kleur was dat makkelijk te volgen, zoals in Fig. 11 is te zien.

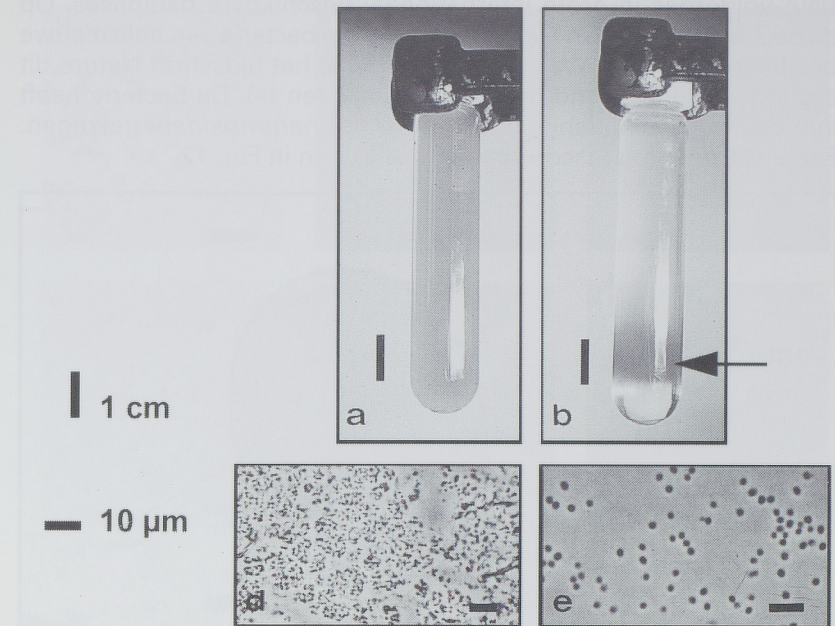


Fig. 11. Zuivering van de onbekende bacterie uit een mengsel van bacteriën door middel van dichtheids-gradiënt-centrifugatie. Door de opvallende rode kleur (hier alleen als een donkere tint te zien) van de dominante bacteriën in het mengsel is het proces met het oog te volgen. In buis (a) zit de mengcultuur overal in de buis. Na centrifugatie (zie b) ontstaat een duidelijke band van bacteriën, zie pijl. Voor verdere uitleg zie tekst. De balkjes in het bovenste deel van de foto zijn 1 cm. In de microscopische beelden in het onderste deel is het balkje 10 micrometer.

De linker centrifugebuis bevat nog een mengsel, zoals u daaronder kunt zien op de microfoto (d). Na centrifugatie zitten de gewenste bacteriën allemaal in de rode band ((b), pijl), terwijl de andere bacteriën elders in de buis zitten. Dat de band nu nog maar één soort bevat kunt u zien aan de tweede microfoto (e). Tellingen wezen uit dat de bacterie voor 99,8 % zuiver was. De cellen uit de rode band zijn daarna afgezogen en door hernieuwde centrifugatie in geconcentreerde vorm verkregen. Uit de aldus gezuiverde cellen hebben we het DNA ge-extraheerd. In de reageerbuis zijn daarna kopieën van unieke delen van het bacterie-DNA gemaakt met speciale enzymen. Voor de fijnproevers wordt opgemerkt dat het hier gaat om het gen van het 16S-ribosomaal-RNA. Daarna is de volgorde van dat gen bepaald en op grond van die volgorde kunnen we het micro-organisme identificeren. Daarvoor heb je een complex computerprogramma nodig, omdat het gaat om het vergelijken van duizenden

DNA-olgordes in grote internationaal beschikbare databases. Op de bacterie-stamboom blijkt de betreffende bacterie een hele nieuwe positie in te nemen. We zijn er trots op dat het tijdschrift Nature dit bijzonder genoeg vond om het te publiceren (4). De bacterie heeft inmiddels de welluidende naam *Brocadia anammoxidans* gekregen. Een elektronenmicroscopische foto is te zien in Fig. 12 .



Fig. 12. Elektronen-microscopische opname van *Brocadia anammoxidans*. De bacterie voedt zich met ammonium en nitriet voor energiewinning. De bacterie gebruikt koolzuurgas als enige koolstofbron, net zoals een plant dat doet. Het balkje in de foto is 0.2 micrometer.

Met de bekende volgorde zijn er vervolgens in de reageerbuis korte DNA-herkenningsmoleculen gemaakt, die door middel van fluorescerende labels de bacterie laten oplichten onder het microscoop. Dat is ook te zien in Fig. 13.

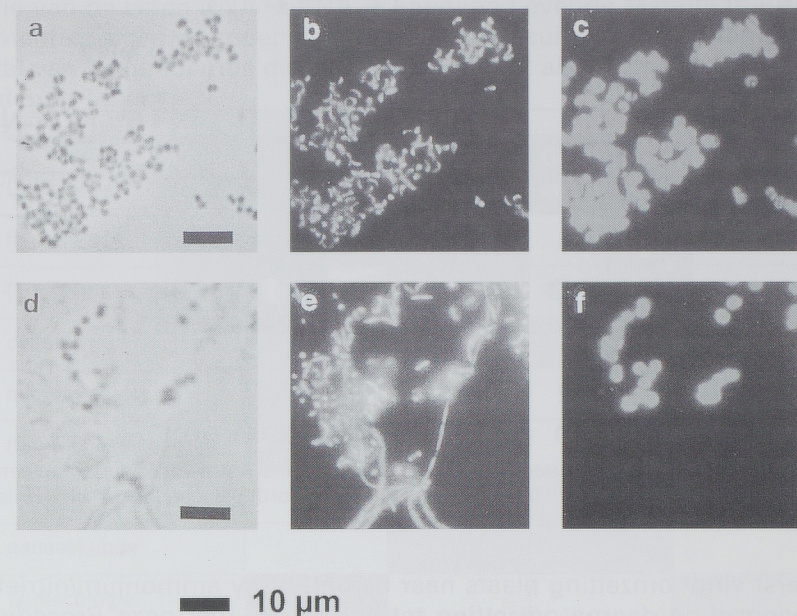


Fig. 13. Detectie van *Brocadia anammoxidans* in reincultuur (a,b,c) en mengcultuur (d,e,f). Links boven en onder (a,d) ziet men de gewone microscopische beelden. In de midden-panelen (b,e) is een algemene DNA-label gebruikt (groen in origineel), terwijl in de twee rechter-panelen (c,f) een (rood) label werd gebruikt dat specifiek was voor *B. anammoxidans* . Voor details zie tekst.

Links ziet men het beeld onder het gewone microscoop, in het midden is het DNA van alle aanwezige bacteriën gekleurd en in het rechterplaatje zijn de nieuwe bacteriën specifiek herkend door het DNA-label. Zo ziet u, we maken ook hier weer gebruik van de eigenschap van de biomoleculen die we hebben nagemaakt in het lab om het echte DNA en RNA in de cel te herkennen.

We kunnen de bacterie nu ook in allerlei mengsels detecteren zoals u uit het onderste paneel van Fig. 13 ziet. Dat is vooral ook belangrijk voor de toepassing omdat we met deze detectie methode snel kunnen zien of onze gewenste bacterie in voldoende aantallen aanwezig is.

Uit het onderzoek, dat door de Stichting Technische Wetenschappen (STW) is gesteund, is inmiddels gebleken dat het proces een goede kans maakt straks in de praktijk te worden toegepast. Hoe het proces er uit ziet is weergegeven in Fig. 14 .

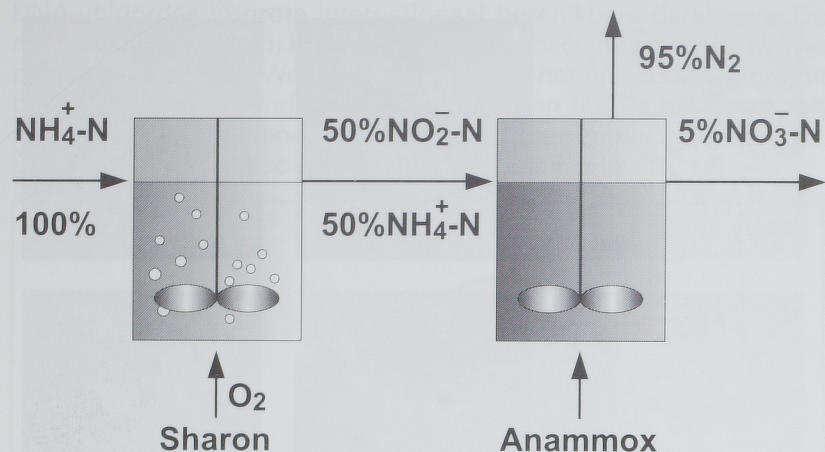


Fig. 14. Schematische voorstelling van het proces voor stikstof-verwijdering uit een afvalstroom die ammonium bevat. De eerste reactor wordt belucht, terwijl de tweede reactor juist zonder zuurstof moet worden bedreven.

Eerst vindt omzetting plaats naar een fifty-fifty ammonium/nitriet mengsel en daarna omzetting tot stikstofgas met onze *Brocadia anammoxidans*. In het proces wordt een kleine hoeveelheid (5%) nitraat gemaakt, dat gemakkelijk verwijderd kan worden. Het voordeel van dit proces is dat geen kostbare hulpstoffen nodig zijn, dat sterk bespaard wordt op dure zuurstof en dat we nauwelijks afvalbacterieslib maken.

Zo hopen we met onze kennis van leven en technologie een bijdrage te leveren aan het schoonmaken en schoon houden van ons milieu. Aldus hopen we ons "duurzaam" bestaan, dat wil zeggen ons overleven op deze aardbol, te helpen garanderen.

Dames en heren, de mogelijkheden van de nieuwe technieken lijken vrijwel onbegrensd. Maar het blijft mensenwerk. En daarom hebben we zeer goed opgeleide mensen nodig. Daarom ook hebben Delft en Leiden het afgelopen jaar samen de nieuwe opleiding "Life Science & Technology" gestart. In deze opleiding leren studenten in de eerste twee jaar de taal spreken van een breed scala aan disciplines, zoals (bio)chemie, (bio)fysica, celbiologie, microbiologie, (bio)procestechnologie, (bio)informatica, geneeskunde, farmacie en, last but not least, wiskunde. Daarna specialiseren de Life Science & Technology-studenten zich in een aantal profielen, De Cel als Fabriek (het maken van producten), Cel Diagnose (toepassen van fysica, informatica, chips), Genoom en Functie (regula-

tie van de keten DNA → RNA → Eiwit) en Levende Materie (fundamentele eigenschappen van biomacromoleculen), waarbij een aantal van de genoemde disciplines prominent aanwezig zijn. Dit is te zien in Tabel 4.

Disciplines	Profielen	De cel als fabriek	Cel diagnose	Genoom en functie	Levende Materie
(bio)chemie					
(bio)fysica					
celbiologie					
microbiologie					
(bio)procestechnologie					
(bio)informatica					
geneeskunde					
farmacologie					
wiskunde					

Tabel 4. Profielen en disciplines van de gezamenlijke Opleiding "Life Science & Technology" van de Technische Universiteit Delft en de Universiteit Leiden. De donkere tinten in de kolommen geven de accenten aan, die de disciplines in de profielen hebben.

Wij denken dat deze studie de grote uitdaging zal zijn voor bèta-georiënteerde meisjes en jongens die de revolutie van deze multidisciplinaire wetenschap willen meemaken en meesturen. Daarbij zullen we er voor zorgen dat de studenten ook voldoende *wijsheid* kunnen opdoen, zodat zij bij het toepassen van de technologie van het leven daarin ook de "kunst" van het leven blijven betrekken.

Tenslotte wil ik afdalen naar het zeer grondstoffelijke: Als u straks op de receptie staat, denkt u dan nog even aan de herkenning van signalen door biomoleculen: op uw tong en in uw neus zitten vele bio-macro-moleculen die uw favoriete drankje of hapje direct herkennen! Die signalen worden doorgegeven en deze, gecombineerd met de andere signalen uit uw omgeving, leveren u uiteindelijk het aangename millennium-receptie gevoel. Mijn verhaal ging over leven. Wat is er beter dan daar straks op te drinken, zoals ze dat in het oude testament reeds deden, "le-chajiem": op het leven! of, met de Nederlandse verbastering van le-chá-jiem: daar ga je!

Gaarne dank ik collega's J.T. Pronk, T. Schalkhammer en J.P. van Dijken voor hun substantiële bijdragen aan deze rede. Ik ben M.S.M. Jetten, M. Strous en L.G.J.M. van Dongen erkentelijk voor het leveren van tekeningen en fotomateriaal, en T.H. Dekker en F. Vogels voor het artistieke en technische werk aan de dia's en figuren. Ik dank G.J. Scheurwater zeer voor redactioneel commentaar.

Referenties

1. F. Valkema. Life Sciences 'Liefdesbaby' voor Jorritsma. Chemisch Weekblad. (1999), 95-7, 5-6
2. H. Tettelin, H.Y. Steensma et al. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII. Nature (1997), 387, S 81-84
3. J.J. ter Linde, H. Liang, R.W. Davis, H.Y. Steensma, J.P. van Dijken, J.T. Pronk. Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. J.Bacteriology (1999), 181, 7409-7413
4. M. Strous, J.A. Fuerst, E.H.M. Kramer, S. Logemann, G. Muyzer, K.T. van de Pas-Schoonen, R. Webb, J.G. Kuenen, M.S.M. Jetten. Missing lithotroph identified as new planctomycete, Nature (1999) 400, 446-449