

- Terminale transferase. Met dit enzym is het mogelijk aan een uiteinde van een DNA-streng nucleotiden toe te voegen zonder dat de aanwezigheid van een matrijs vereist is.
- DNA-ligase. Een enzym dat de vorming van fosfodiësterbindingen katalyseert op de plaats van enkelstrengsbreuken in het DNA. Het kan worden gebruikt voor een efficiënte koppeling van DNA-fragmenten aan het vector-DNA wanneer beide typen DNA met hetzelfde restrictie-enzym zijn geknipt.

#### PROBES

Met behulp van restrictie-enzymen kan het genoom in een groot aantal fragmenten verdeeld worden en vervolgens ingebouwd in een geschikte vector. Na de clonering in een gastheer ontstaat een bank of bibliotheek die het totale DNA van het onderzochte individu bevat.

Het herkennen van de kloon met het gen dat men wil onderzoeken lijkt welhaast onmogelijk vanwege het grote aantal. Men kan echter radioactief gemerkte complementaire moleculen (probes) gebruiken en door middel van autoradiografie nagaan waar hybridisatie optreedt. (Zie hiervoor het artikel in dit tijdschriftnummer over de methoden van de moleculaire genetica (1987; 2123-8).) Daarbij wordt een duplexmolecuul gevormd wanneer de basevolgorden in de twee strengen volmaakt complementair zijn. Het DNA- of RNA-molecuul dat gebruikt wordt om vast te stellen of het gewenste gen aanwezig is, wordt probe genoemd. Naast de vaak toegepaste methode een probe van een collega over te nemen ('cloning by phoning') zijn er verschillende mogelijkheden om de gewenste probe te maken.

*Synthese en clonering van complementair DNA.* Praktisch alle mRNA-moleculen die in een menselijke cel aanwezig zijn, bezitten een poly-A-staart. Na toevoeging van het complementaire poly-T kan zodoende een dubbelstrengs stukje AT ontstaan dat als startpunt kan dienen voor DNA-synthese met behulp van het enzym reverse transcriptase. Van het mRNA wordt op deze manier een exacte DNA-kopie gevormd (cDNA). Het

DNA-molecuul kan dubbelstrengs gemaakt worden en na inbouw in een vector gecloneerd. Door middel van hybridisatie met mRNA worden de gecloneerde cDNA's herkend. Deze kunnen in vitro getranslateerd worden, zodat aan de hand van het geproduceerde eiwit kan worden nagegaan welk gen in een bepaalde vector is ingebouwd. Het gewenste DNA kan vervolgens in grote hoeveelheden worden opgekweekt.

*Oligonucleotide probes.* Zodra (een gedeelte van) de aminozuurvolgorde van een eiwit bekend is, kunnen van een stukje dat 5 tot 6 aminozuren omvat, alle mogelijke coderingen op RNA- en DNA-niveau worden voorspeld. Deze oligonucleotidensequenties worden synthetisch bereid en gebruikt voor het screenen van een DNA-bank. Tevens kan men er gebruik van maken bij de herkenning van specifiek mRNA en als 'primer' voor de synthese van cDNA met behulp van reverse transcriptase.

Bij de beschrijving van de basisbegrippen van de moleculaire genetica is het onmogelijk de stof van een aantal tekstboeken samen te vatten in enkele pagina's zonder veel weg te laten. Een nadere kennismaking met de methoden van de moleculaire genetica komt in het tweede artikel in dit tijdschriftnummer aan de orde.

#### LITERATUUR

- <sup>1</sup> Nathans D, Smith HO. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann Rev Biochem* 1975; 44: 273-93.
- <sup>2</sup> Kessler C, Neumaier PS, Wolf W. Recognition sequences restriction endonucleases and methylases - a review. *Gene* 1985; 33: 1-102.

#### AANBEVOLEN LITERATUUR

- Dillon JAR, Nasim A, Nestman ER, eds. *Recombinant DNA methodology*. New York: Wiley, 1985.
- Emery AEH. *An introduction to recombinant DNA*. Chichester: Wiley, 1984.
- Old RW, Primrose SB. *Principles of gene manipulation*. Oxford: Blackwell, 1985.
- Watson JD, Tooze J, Krutz DT. *Recombinant DNA*. New York: Scientific American Books, 1983.

Aanvaard op 13 juli 1987

## Methoden van de moleculaire genetica

J. P. M. GERAEDTS

Dit is het tweede artikel over de materialen en methoden van de moleculaire genetica. Hoewel de gebruikte methoden voortdurend veranderen, kan een aantal principes worden aangegeven. In dit onderdeel komen methoden voor genclonering en de toepassing hiervan bij de diagnostiek van (erfelijke) aandoeningen ter sprake.

Rijksuniversiteit Limburg, Vakgroep Genetica/Celbiologie, Postbus 616, 6200 MD Maastricht.  
Prof.dr. J.P.M. Geraedts, antropogeneticus.

#### MOLECULAIRE CLONERING

Moleculaire clonering is een techniek waarmee een groot aantal identieke kopieën van één DNA-fragment verkregen kan worden. Dit gebeurt door de replicatie van de vector die het gewenste fragment heeft opgenomen, in een geschikte gastheer. Men begint met het knippen van de geïsoleerde of speciaal geconstrueerde vector en het in te bouwen DNA met behulp van hetzelfde restrictie-enzym. Wanneer hierbij enkelstrengs uiteinden ontstaan, dan kan het recombinant-DNA eenvoudig

gevormd worden door onderlinge verbinding met behulp van DNA-ligase. Wanneer het gebruikte endonuclease geen enkelstrengs uiteinden oplevert, dan moet voor een efficiënte fusie van de fragmenten eerst aan beide kanten een geschikte nucleotidenvolgorde worden gesynthetiseerd. De opname van de recombinante vector door de gastheercel kan zowel spontaan geschieden alsook door de cel extra toegankelijk te maken. De efficiëntie van clonering is afhankelijk van de replicatie van het recombinant-DNA.

Iedere getransformeerde bacterie zal tot een kolonie met miljoenen cellen uitgroeien, waarbij eveneens de recombinante vector gerepliceerd wordt.

#### *DNA-bibliotheken en genenbanken*

Door moleculaire clonering kan een complete verzameling DNA-fragmenten van een individu worden verkregen. Naast het in kweek brengen en opslaan van fibroblasten is zo een nieuwe mogelijkheid ontstaan ook na de dood van de patiënt onderzoek te kunnen doen. Het DNA kan volledig willekeurig gefragmenteerd zijn door sonicatie (met ultrageluidstrillingen) of specifiek geknipt met restrictie-enzymen. Op deze manier kan een heel genoom (inclusief alle niet-coderende sequenties) worden gekweekt en opgeslagen. Wanneer in de verzameling DNA-fragmenten het hele genoom vertegenwoordigd is, spreekt men van een genomische DNA-bank of -bibliotheek. Om dit te bereiken zijn wel enkele honderdduizenden verschillende klonen nodig.

Een cDNA-bank bevat complementaire DNA-kopieën van de totale populatie mRNA-moleculen van één celtype. In dit geval bevat de collectie uitsluitend genen die tot expressie zijn gekomen. Tenslotte wordt steeds meer gebruik gemaakt van chromosoomspecifieke DNA-banken. Deze kunnen worden verkregen door de clonering van DNA dat is geïsoleerd na de scheiding van een chromosomale fractie. Bij het opzetten van een recombinant-DNA-bank is het essentieel dat een mogelijkheid bestaat de gewenste recombinante vectoren te selecteren en analyseren. Van veel belang hierbij is een directe selectiemethode, bijvoorbeeld op basis van resistentie tegen antibiotica, specifieke metabolieten of hoge temperaturen.

#### *Selectie van recombinante plasmiden*

Na het transformatieproces is slechts een gering gedeelte van de bacterie-populatie door een plasmide getransformeerd. Bij de eerste selectie gebruikt men de aanwezigheid van een actief antibioticum-resistentie-gen als merker (tabel). Of de verkregen kolonies zijn ontstaan door

Gebruik van een antibioticum-resistentie-gen als merker voor de selectie van recombinante plasmiden

<i>resistentie tegen</i>		<i>resultaat</i>
<i>ampicilline</i>	<i>tetracycline</i>	
+	+	geen inbouw van vreemd DNA
+	-	DNA-inbouw in tetracyclineresistentie-gen
-	+	DNA-inbouw in ampicillineresistentie-gen

transformatie met 'lege' dan wel recombinante plasmiden is niet zonder meer te zien. De tweede selectie gebruikt dan de inactivering van een tweede antibioticum-resistentie-gen als gevolg van insertie met vreemd DNA. De kolonies welke ampicilline-resistent zijn, maar niet gevoelig voor tetracycline bevatten dus een recombinant plasmide. Bij deze zeer bewerkelijke methoden moeten steeds vele honderden kolonies apart getest worden.

Een kort geleden ontwikkeld type plasmide ondervangt dat bezwaar. Behalve een antibioticum-resistentie-gen en restrictieplaatsen heeft dat plasmide een  $\beta$ -galactosidase-gen. In lege plasmiden is dit gen actief; in de agarplaat wordt dan een blauwe kleurstof gevormd. Bij recombinante plasmiden wordt het gen geïnactiveerd; er ontstaan dan ongekleurde kolonies, die bovendien veel groter zijn.

#### *Selectie van bacteriofagen*

Na transfectie met bacteriofagen is duidelijk te zien welke bacteriën de vector hebben opgenomen. Op die plaatsen ontstaan in de voedingsbodem plaques, d.w.z. gebieden waar de bacterielaag is aangetast door de zich vermenigvuldigende fagen in de bacteriecel. In analogie met de hierboven beschreven nieuwe generatie plasmiden zijn er ook bacteriofaagvectoren met een inactiveerbaar  $\beta$ -galactosidase-gen. 'Lege' bacteriofagen vormen dan blauwe plaques, recombinante fagen kleurloze.

#### *Screening op specifieke fragmenten*

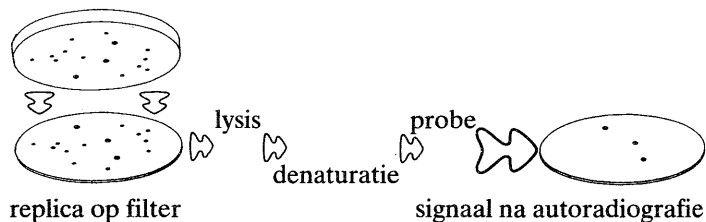
Nadat is vastgesteld welke klonen recombinant-DNA bevatten moeten de gewenste specifieke sequenties worden geselecteerd. Voor de isolatie kan in sommige gevallen gebruik gemaakt worden van antilichamen tegen een genproduct dat eventueel geproduceerd wordt. In de meeste gevallen vindt echter hybridisatie plaats. Deze methode kan altijd worden toegepast, dus ook bij sequenties die niet tot expressie komen, zolang er maar een geschikte probe beschikbaar is. Het onderzoek gebeurt door een afdruk te maken van de plaat waarop zich het recombinant-DNA bevindt en deze te hybridiseren met een probe die radioactief is gemerkt door nicktranslatie.

#### *Moleculaire hybridisatie*

De 2 strengen van een duplex DNA-molecuul kunnen van elkaar worden gescheiden. Dit proces heet denaturatie en vindt plaats na verhitting in een zoutoplossing of blootstelling aan een hoge pH. Bij verlaging van de temperatuur of zuurgraad zal vervolgens weer een duplex ontstaan, doordat tussen de complementaire baseparen weer waterstofbruggen gevormd worden. Deze moleculaire hybridisatie kan plaatsvinden tussen alle nucleïnezuren die complementair zijn, dus zowel tussen DNA als RNA. Deze eigenschap gebruikt men om na te gaan of in een mengpopulatie een bepaalde unieke sequentie uit het genoom vóórkomt.

Aan het te onderzoeken gedenatureerde DNA wordt een gemerkte enkelstrengs probe toegevoegd. Zodra een complementaire sequentie aanwezig is, zal één van de strengen van de oorspronkelijke duplex associëren met

kolonies op plaat



FIGUUR 1. De herkenning van bacteriekolonies die een specifiek recombinante plasmide bevatten. In de bacteriën die na autoradiografie een signaal geven, zijn nucleotidenvolgorde ingebouwd die homoloog zijn aan de gemerkte cDNA-probe.

de probe. Dit is te onderscheiden aan de hand van de merkstof. Bij het gebruik van radioactiviteit kan de hybridisatie worden aangetoond door middel van autoradiografie. Vaak wordt de probe gemerkt door nick-translatie.<sup>1</sup> Dit is een werkwijze waarbij het DNA eerst licht beschadigd wordt door een DNase I-behandeling en de teweeggebrachte schade vervolgens wordt hersteld door polymerase I, dat zorgt voor de inbouw van nucleotiden die radioactief gemerkt zijn.

Ook andere merktechnieken van probes worden toegepast. Er zijn directe methoden waarbij de merkstof, meestal een fluorochroom, direct wordt gekoppeld aan de probe. Op een indirecte manier kan men de hybride detecteren via immunocytochemisch onderzoek met behulp van antilichamen. Voordelen van deze alternatieve methoden zijn de snelheid en de betere resolutie, het nadeel is (nog) een geringere gevoeligheid.

#### Kolonie-hybridisatie

Deze methode wordt gebruikt voor de herkenning van bacteriekolonies die recombinante plasmiden bevatten. Eerst wordt een replica van de kolonies op de voedingsbodem gemaakt door overbrengen op een nitrocellulose filter (figuur 1). Na lysis van de kolonies op het filter wordt het vrijgekomen DNA gefixeerd aan het filter door dit te bakken. De kolonies die na hybridisatie een positief

autoradiogram tonen, kunnen dan worden geïsoleerd vanuit de originele voedingsbodem.

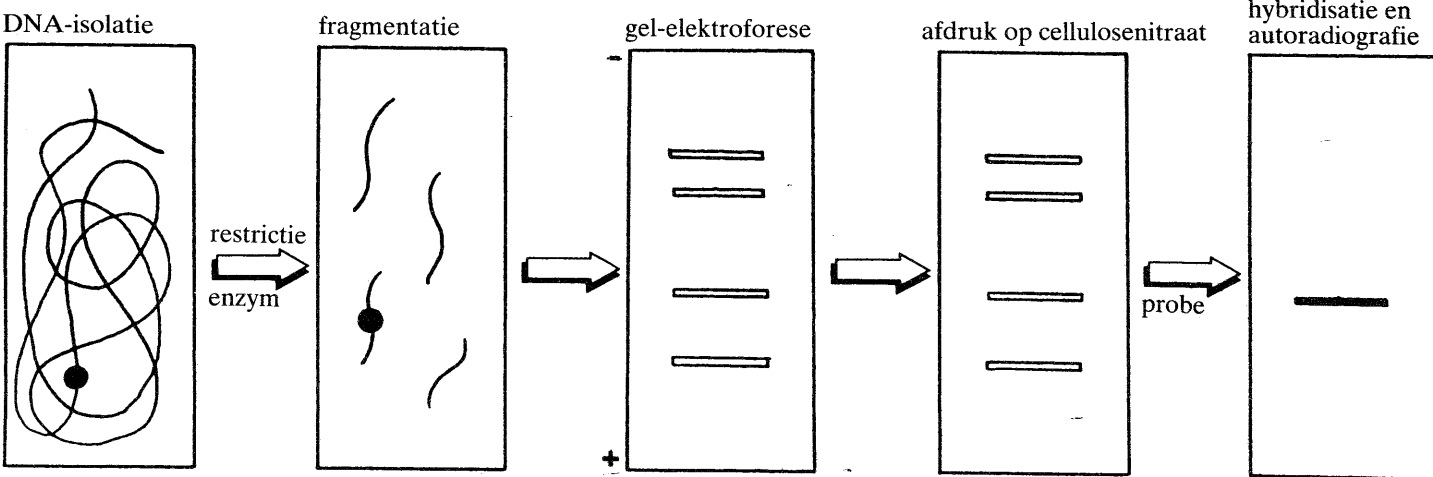
Met een variant van deze hybridisatiemethode kan worden nagegaan waar op een filter, dat een directe afdruk is van een plaat, recombinante fagen gelokaliseerd zijn.

#### Southern-hybridisatie

Deze standaardmethode, geïntroduceerd door Southern in 1975, spoort met een bepaalde probe unieke DNA-fragmenten op in enkele microgrammen van het totale DNA.<sup>2</sup> Eerst wordt dubbelstrengs DNA geknipt met restrictie-enzymen; scheiding van de fragmenten op molecuulgewicht volgt in een agarose-gel. Na denaturatie wordt een afdruk van de gel gemaakt op een nitrocellulose filter (figuur 2). Herkenning van specifieke fragmenten op het filter vindt plaats door hybridisatie met een gelabelde probe die autoradiografisch herkend wordt. Het bandenpatroon dat zichtbaar wordt, is een exacte replica van het bandenpatroon van de op grootte gescheiden moleculen in de gel.

Met de conventionele elektroforese is het onmogelijk om fragmenten groter dan 20 kilobasen (kb) te scheiden. Bij een onlangs geïntroduceerde scheiding met elektroforese worden de DNA-moleculen onderworpen aan twee alternerende elektrische velden, die met een hoek van 90 tot 180° op elkaar staan. Iedere keer dat de elektroforese-richting verandert, zullen ook de DNA-moleculen een andere kant op bewegen. De snelheid waarmee dit gebeurt, is een functie van de lengte van de moleculen. De orthogonale elektroforesemethode is kortgeleden gebruikt voor de scheiding van gischromosomen die meer dan 2000 kb groot zijn. Voor de bepaling van de molecuulgewichten wordt de migratiesnelheid vergeleken met die van referentiemoleculen van bekend gewicht.

De Northern-hybridisatie is een variant op de Southern-hybridisatie en wordt toegepast om specifieke mRNA-moleculen op te sporen. RNA, geëxtraheerd uit bijv. cellen, wordt gescheiden door middel van gelelektroforese. Een afdruk van deze gel wordt nu gehybr-



FIGUUR 2. Schematische weergave van de gang van zaken bij de Southern-hybridisatie. ●: DNA-fragment dat wordt herkend door de gebruikte probe.

diseerd met gelabelde DNA-probes. Deze methode is geschikt om de lengte van een gecloneerd cDNA te vergelijken met die van het oorspronkelijke mRNA.

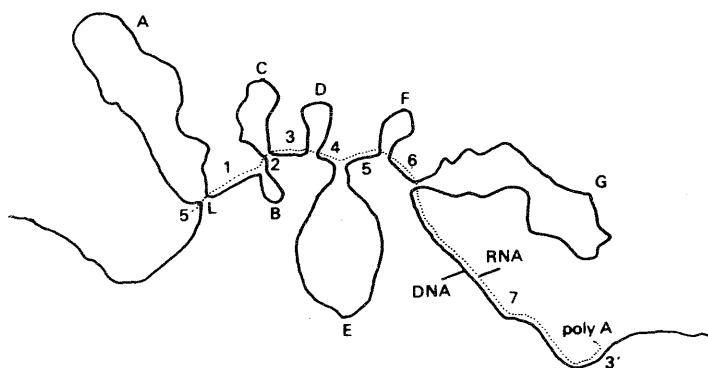
Een andere variant is de *dot-hybridisatie*. Bij deze snelle screeningsmethode worden kleine testmonsters direct op nitrocellulose filters gebracht, gefixeerd en gehybridiseerd. Het is een erg geschikte methode voor diagnostiek omdat de dots gemaakt kunnen worden van gelyseerd celmateriaal en de enige vereiste dan de aanwezigheid van een geschikte probe is. De analyse van een mutatie kan tegenwoordig ook op deze manier bij een klein aantal cellen. De korte DNA-sequentie die herkend wordt, kan in de reageerbuis zo vaak vermenigvuldigd worden dat herkenning op een filter na hybridisatie mogelijk wordt.

#### RNA-DNA-hybridisatie

Een heteroduplex ontstaat wanneer twee verschillende moleculen, die niet helemaal complementair zijn, een dubbelstreng vormen. Gebeurt dit door een enkelstrengs genfragment te hybridiseren met het bijbehorende mRNA, dan zal het dubbelstrengs hybridemolecuul bij elektronenmicroscopisch onderzoek uitstulpingen vertonen op die plaatsen waar het DNA met mRNA wordt overgeschreven, de zogenaamde introns (figuur 3). Op deze manier kan worden uitgezocht hoeveel niet-codeerende segmenten er zijn en waar ze zijn gelegen. Tevens is een redelijk nauwkeurige bepaling van de lengte mogelijk omdat bekend is dat 1  $\mu\text{m}$  van een dubbelstrengs nucleïnezuurmolecuul ongeveer 3000 nucleotiden bevat. Een nauwkeurige bepaling van het aantal en de lengte van de coderende DNA-volgorden (exons) is mogelijk na elektroforese nadat de enkelstrengs lussen (introns) zijn afgebroken met een bepaalde endonuclease.

#### In situ-hybridisatie

Deze hybridisatietechniek wordt toegepast om van een bepaalde sequentie de plaats te bepalen binnen een celorganel of bijv. op een chromosoom. Een dergelijke microscopische hybridisatie-detectie vereist zeer 'heet'



FIGUUR 3. Schematische weergave van elektronenmicroscopische opname van hybridisatie tussen DNA (—) en mRNA (.....). Waar het DNA en het mRNA complementair zijn, wordt een dubbele streng (heteroduplex) gevormd. Op de plaatsen van de introns zijn duidelijk de lussen zichtbaar die gevormd worden door het enkelstrengs DNA. Op deze manier kan o.o. het aantal introns van een gen bepaald worden.

(hoog radioactief) gemerkte probes. De chromosomale lokalisatie van genen op metafasechromosomen vraagt bovendien statistische analyse van waarnemingen in meerdere cellen. De in situ-hybridisatietechniek is ook geschikt voor de detectie van virus-DNA. In beginsel is deze techniek ook op elektronenmicroscopisch niveau uitvoerbaar.

#### Restrictiekartering

Deze methode is uitermate geschikt voor de analyse van kleine genomen of kleinere gecloneerde fragmenten van de complexe genomen van hogere organismen. Restrictiekartering wil zeggen dat de herkenningplaatsen van restrictie-enzymen in kaart worden gebracht. De uitvoering van het onderzoek kan op verschillende manieren geschieden. In het kort komt het erop neer dat door middel van scheiding met behulp van elektroforese wordt nagegaan of en zo ja, hoeveel fragmenten ontstaan door incubatie met één of meerdere restrictie-enzymen. Door een vergelijking van de resultaten van meerdere experimenten kan worden geconcludeerd hoeveel knipplaatsen er zijn en in welke volgorde ze liggen.

#### Basevolgordebepaling

In 1977 werden onafhankelijk van elkaar twee methoden geïntroduceerd die een snelle bepaling van de basevolgorde van een DNA-fragment mogelijk maakten. Bij de methode van Maxam en Gilbert wordt gebruik gemaakt van verschillende chemische reacties die elk de nucleotidenketen(s) bij één van de vier basen kunnen splitsen. Wanneer het uiteinde van het te onderzoeken fragment vooraf radioactief gemerkt is, dan zal na elektroforese en autoradiografie een bandenpatroon ontstaan, dat karakteristiek is voor de basevolgorde van het molecuul dat zowel enkel- als dubbelstrengs kan zijn.<sup>3</sup> Bij de methode van Sanger is het daarentegen een vereiste dat gewerkt wordt met enkelstrengs DNA, dat om die reden meestal gecloneerd is in de bacteriofaag M13. Op een bepaalde manier ontstaat een groot aantal verschillend lange fragmenten, die gemeen hebben dat ze de plaats laten zien waar een gemodificeerd nucleotide is ingebouwd waardoor de synthese tot stilstand is gekomen.<sup>4</sup> Deze proef kan gedaan worden voor elk van de vier basen, zodat de volledige volgorde van de nucleotiden en daarmee ook de aminozuurvolgorde van het gecodeerde eiwit kan worden opgehelderd. Door een verdere automatisering van deze methoden en de toepassing van computeranalyses is het nu in principe mogelijk het gehele menselijke genoom aan een sequentie-analyse te onderwerpen, een onderneming waaraan in 1986 veel discussie werd gewijd. De kosten bedroegen op dat moment echter ongeveer een dollar voor elk van de  $3 \times 10^9$  nucleotiden.

#### DE KARAKTERISERING EN DIAGNOSTIEK VAN MUTATIES

Mutaties kunnen worden onderverdeeld in drie groepen: genoom-mutaties, chromosoom-mutaties en gen-mutaties. De eerste twee typen zijn voor microscopisch

onderzoek herkenbaar en betreffen de aan- of afwezigheid van een complete set resp. van één of enkele individuele chromosomen. Genafwijkingen zijn microscopisch niet aantoonbaar. De aanwezigheid van een mutatie kon daarom tot voor kort slechts worden verondersteld op basis van typische afwijkingen van het fenotype. In een klein deel kon op eiwitniveau een (enzym)eiwitverandering worden vastgesteld.

Van de monogeen (en in de toekomst van sommige multifactorieel) erfelijke aandoeningen zal DNA-diagnostiek een aanvulling gaan brengen op de klassieke diagnostiek. DNA, geïsoleerd uit weefsel, cellen uit perifeer bloed of chorionvlokken kan gebruikt worden voor (prenatale) (en eventueel presymptomatische) diagnostiek, waarbij of de mutatie zelf direct aangetoond wordt, of indirect in een familie gevolgd wordt via polymorfe merkers in DNA structuren vlakbij de betreffende genmutatie (RFLP-merker onderzoek).

#### Directe analyse van mutaties

Als een mutatie gepaard gaat met het verlies of de vorming van een herkenningsplaats van een restrictie-enzym, dan kan deze verandering gemakkelijk herkend worden door de toepassing van het betreffende enzym. Na de Southern-hybridisatie zal de mutatie leiden tot een band meer of minder dan in de uitgangssituatie. Deze directe methode van herkenning is slechts mogelijk voor een beperkt aantal aandoeningen. Een voorbeeld is de sikkelcel-anemie. Het voordeel van deze methode is dat onderzoek van cellen van patiënten een direct antwoord geeft zonder de noodzaak van familieonderzoek.

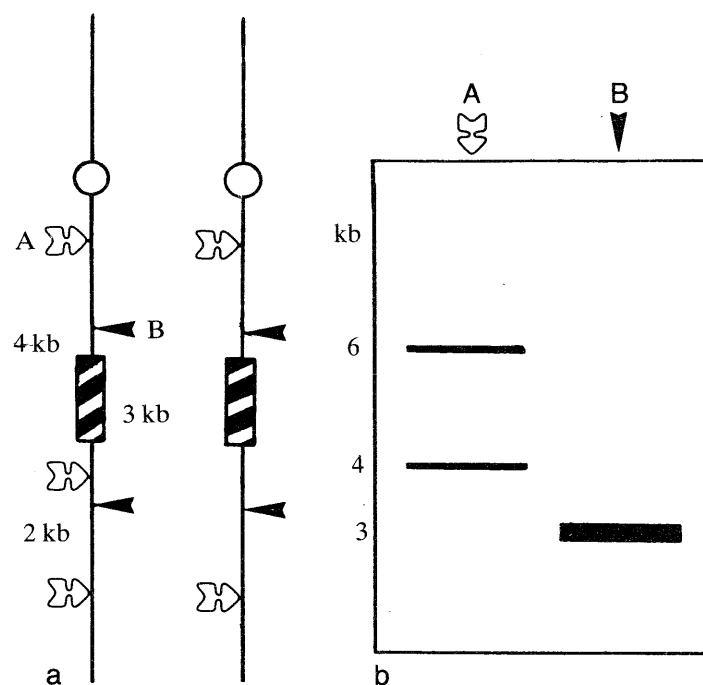
Een afgeleide methode, gebruikt voor een directe herkenning van een mutatie berust op het gebruik van korte synthetische DNA-fragmenten als probes. Deze oligonucleotiden kunnen hybridiseren met compleet homologe sequenties, maar niet met heterologe die in één of meerdere nucleotiden verschillen. Zodra de gemuteerde DNA-sequentie bekend is, kunnen computergestuurde machines geheel automatisch deze synthetische probes van ongeveer 20 nucleotiden fabriceren. De mutatie moet niet alleen bekend, maar liefst ook uniek zijn. Anders blijft er een te grote kans dat een tot dusverre onbekende mutant aanwezig is. Ondanks deze bezwaren neemt de toepassing van deze methode snel toe.

Een derde methode maakt gebruik van het feit dat niet alleen de knipplaatsen door mutatie kunnen veranderen, maar ook de afstanden tussen de knipplaatsen. In steeds meer gevallen blijkt dat een (partiële) deletie ten grondslag ligt aan een Mendeliaans overervend defect. Een deletie van een gebied dat naast de door de probe herkende sequentie ligt, zal een verschuiving van de band na Southern-hybridisatie tot gevolg hebben. Bij deleties die de probe omvatten, verdwijnen de banden volledig. Bij heterozygotie voor een deletie is er een kwantitief verschil met de normale situatie: slechts één van de twee chromosomen draagt dan bij aan het tot stand komen van de band. Bij homozygotie is er een kwalitatief verschil, omdat de betreffende band compleet verdwenen is.

#### RFLP-analyse

Wanneer een genmutatie niet herkenbaar is met behulp van een directe methode kan langs indirecte weg toch een betrouwbare indruk gekregen worden van de overerving van het afwijkende gen. Er is een grote kans dat in het chromosomale gebied dat het gen flankeert, één of meer mutaties voorkomen in een niet-coderende unieke sequentie. Deze mutaties hebben in het geheel geen consequenties en komen eens per elke 100 à 200 nucleotiden voor. Men spreekt van polymorfisme, omdat meerdere vormen naast elkaar kunnen voorkomen zonder dat sprake is van een afwijking. De polymorfismen erven codominant over en kunnen gebruikt worden voor het traceren van ziekmakende genen in meerdere generaties. Het gevolg van de mutaties is dat knipplaatsen van restrictie-endonucleasen ontstaan of verdwijnen, waardoor fragmenten van grotere of kleinere lengten kunnen worden herkend na Southern-hybridisatie (figuur 4). Dit vormt de verklaring van de afkorting RFLP: restrictie-fragment-lengte-polymorfisme. De lengteverschillen kunnen worden aangetoond met een probe die het gekoppelde gen detecteert of een willekeurige andere genoomprobe uit het gebied.

Deze methode, ontwikkeld in 1970, werd eerst toegepast bij lagere organismen. Botstein et al. stelden in 1980

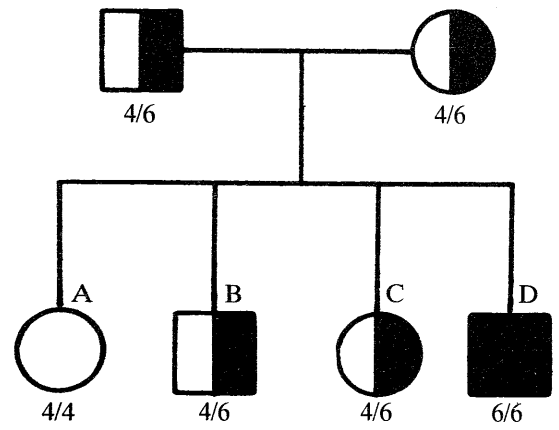


FIGUUR 4. Schematische weergave van het RFLP-onderzoek. (a) Chromosomale situatie. De knipplaatsen zijn aangeduid met pijlen en het door de probe herkende gebied is gearceerd. Enzym A knipt in het linker chromosoom op 3 plaatsen, zodat 2 fragmenten ontstaan van resp. 4 en 2 kb. Het rechter chromosoom heeft 2 knipplaatsen en er ontstaat een fragment van 6 kb. Enzym B knipt in beide chromosomen een fragment van 3 kb. (b) RFLP-patroon na Southern-hybridisatie. Er is een duidelijk onderscheid tussen de twee banden bij A vanwege de heterozygotie. De band onder B bevat de fragmenten van beide chromosomen en is daarom in principe twee keer zo sterk.

toepassing voor bij de mens.<sup>5</sup> Om een goede uitspraak te kunnen doen over het genotype van een individu moet er een informatieve combinatie van polymorfismen bij de ouders zijn. Tevens moet bekend zijn welk restrictie-polymorfisme op het chromosoom met de mutatie ligt. Bij een recessieve aandoening is dat te achterhalen door onderzoek van de ouders en de zieke en gezonde kinderen (figuur 5). Bij andere overervingspatronen is vaak meer uitgebreid familie-onderzoek nodig. Het polymorfisme moet bovendien dicht in de buurt van het gen liggen zodat er slechts een kleine kans is dat recombinatie een fout-positieve of fout-negatieve uitslag veroorzaakt. Gemiddeld vindt eens per  $10^8$  nucleotiden per meiose een recombinatie plaats. Bij een gelijke verdeling geeft een afstand van 10 kb tussen gen en polymorfisme daarom een zekerheid van 99,99%.

RFLP's kunnen ook gebruikt worden voor de diagnostiek van Mendeliaans overervende aandoeningen waarvan het defect op genniveau nog niet bekend is en er dus ook geen gen-probe beschikbaar is. In dat geval worden chromosoom-specifieke of willekeurige gecloneerde DNA-restrictiefragmenten van het genoom gebruikt om probes te maken. Vervolgens vindt een min of meer grootschalig segregatie-onderzoek plaats om polymorfismen te vinden die gekoppeld zijn met het gen waarvoor belangstelling bestaat. Zodra koppeling van het ziektegen met het polymorfisme is aangetoond, kan in principe op dezelfde manier als boven beschreven worden verder-gewerkt.

De belangrijkste voorwaarden voor een succesvolle diagnostiek zijn ook een hoge mate van polymorfie en een nauwe koppeling om de kans op recombinatie zo klein mogelijk te maken. Indien mogelijk verdient het gebruik van meerdere polymorfismen, die aan weerszijden van het gen zijn gelegen, de voorkeur. Zo kunnen de twee haplotypen van de homologe chromosomen van een paar worden onderscheiden. Hiervoor is onderzoek van meerdere individuen in meerdere generaties vereist. Bij gezonde individuen wordt evenveel informatie verkregen over de rangschikking van de kenmerken als bij aangedane personen. RFLP's zijn in toenemende mate van betekenis voor het dragerschaponderzoek en de prenatale diagnostiek van erfelijke ziekten. Tevens is de ontdekking van een gekoppeld RFLP een goed startpunt voor de isolatie van het (mutante) gen en de ontwikkeling van directe detectiemethoden. Het valt niet te verwachten dat deze directe diagnostiek het in de komende jaren zal winnen van de RFLP-analyse. In veel situaties is sprake van genetische heterogeniteit, d.w.z. dat op genotypisch niveau verschillende mutaties aanwezig kunnen zijn. Het onderzoek met behulp van RFLP's kan inzicht verschaffen in de segregatie van meerdere typen.



FIGUUR 5. De resultaten van Southern-hybridisatie bij een gezin, waarbij gebruik gemaakt werd van het polymorfisme uit figuur 4.

Individue D heeft een recessieve aandoening en is homozygoot voor band 6. Beide ouders zijn heterozygoot. Uit de hybridisatie-patronen is afgeleid dat individu A homozygoot normaal is, terwijl de beide andere kinderen ook heterozygoot zijn.

De boven beschreven technieken zijn allereerst van belang voor het fundamentele onderzoek naar de structuur van genen en de organisatie van het genoom. Kennis hiervan is van groot belang voor de toepassing van moleculair-genetische methoden op veel terreinen van de geneeskunde. Het gaat hierbij o.a. om de opsporing van mutaties waardoor de preventie van erfelijke aandoeningen en kanker mogelijk wordt. Ook de therapie kan profiteren van de nieuwe verworvenheden. Dit betreft vooral de productie van geneesmiddelen. Gentherapeutische toepassingen zijn in de nabije toekomst waarschijnlijk slechts bij uitzondering mogelijk.

#### LITERATUUR

- 1 Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling DNA to high specific activity in vitro by nicktranslation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977; 113: 237-51.
- 2 Southern EM. Detection of specific sequences of DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-17.
- 3 Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 560-4.
- 4 Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 1981; 214: 1205-10.
- 5 Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 314-31.

#### AANBEVOLEN LITERATUUR

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

Aanvaard op 13 juli 1987