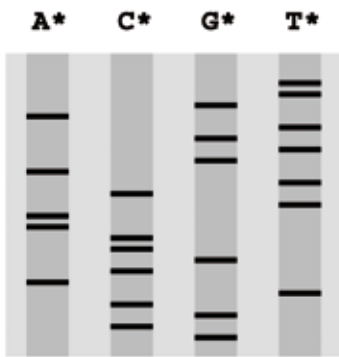


kleinste DNA-fragmenten bereiken het eerst het eind van het capillair, naarmate de DNA-fragmenten groter zijn, arriveren zij daar steeds later. De scheiding van DNA-fragmenten is dermate precies, dat twee fragmenten, die maar één base in lengte van elkaar verschillen, bijvoorbeeld twee fragmenten van 151 en 150 basen, keurig achter elkaar het eindpunt van de capillair bereiken, eerst het fragment van 150 en daarna dat van 151 basen.

ANALYSE VAN DE BASEVOLGORDE

Door de complementaire DNA-fragmenten uit elke portie 'soep', in het vroegere geval van het radioactief labelen van A*, C*, G* en T*, in een aparte baan van een gel op grootte te scheiden, krijgt men per baan de posities van één nucleotide in de complementaire DNA-streng van interesse te zien. Het simultaan bestuderen van de vier banen geeft dan de onderlinge posities van alle vier basen in de complementaire DNA-fragmenten (Figuur VI-35). Deze basenvolgorde, die complementair is aan die van de oorspronkelijke DNA-streng, waarvan de RNA-streng wordt overgeschreven, beschouwt men over het algemeen als **de** basenvolgorde: men laat de 'terugrekening' naar de eigenlijke basenvolgorde achterwege.

Zoals al gezegd, geschiedt DNA-sequencen tegenwoordig volledig geautomati-




GCGCTACGCCAATCTAGTGTAGTT


(CGCGATGCGGTTAGATCACATCAA)

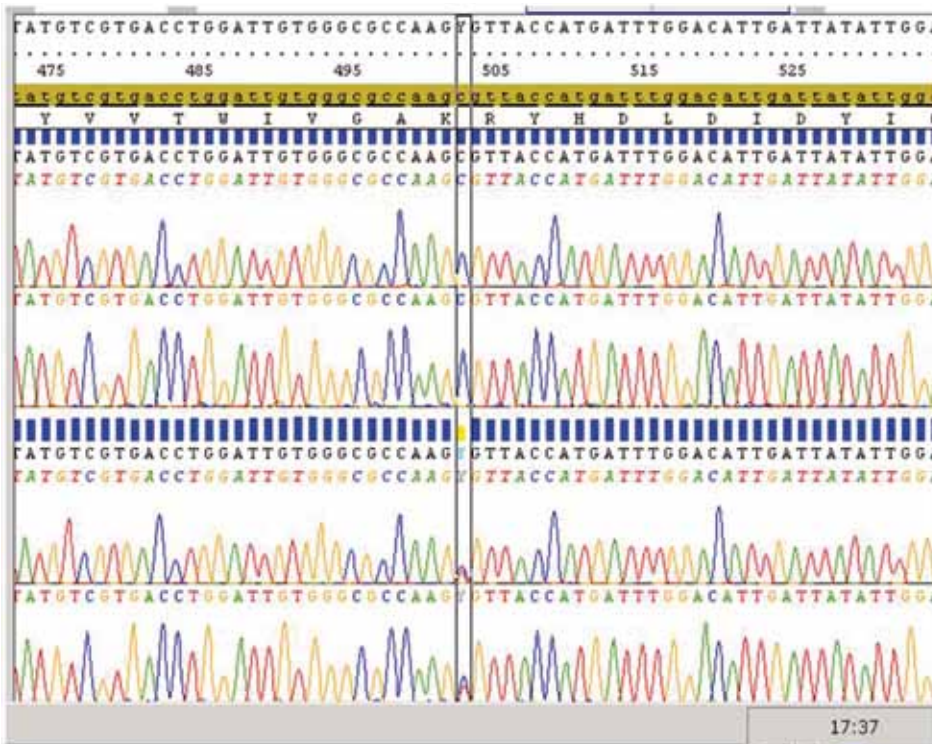
Figuur VI-35. Het principe van het bepalen van de basenvolgorde van DNA (**DNA-sequencing**). In de figuur zien we vier banen van een gel, voor elke nucleotide één, met bandjes op de posities van de DNA-fragmenten met een A*, T*, C* en G* op het eind en daaronder zien we de daaruit af te leiden **DNA-sequentie**. De bewegingsrichting van de DNA-fragmenten was van boven naar beneden. De kleinste DNA-fragmenten lopen het hardst, dus het onderste zal het kleinste zijn, dit is het fragment eindigend met een C*. Het op één na kleinste DNA-fragment is het op één na onderste in de vier parallelle gels en dat eindigt met een C*, enzovoorts. Door een lineaal vanaf het onderste bandje naar boven te schuiven en van elk bandje dat men tegenkomt de bijbehorende base te noteren, krijgt men de basenvolgorde van het complementaire DNA-fragment (bovenste DNA-streng). Dit noemt men nu **de** basenvolgorde van het stuk DNA van de DNA-streng waarvan de RNA-streng wordt overgeschreven: men laat de omrekening terug naar de werkelijke, complementaire basenvolgorde achterwege (onderste DNA-streng tussen haakjes).

seerd. Bovendien vindt het sequencen van het DNA, door de verschillende kleuren van fluorescentie van de fluorescerende kleurstoffen waarmee A*, T*, C* en G* zijn gemerkt, in één reageerbuisje plaats. Om dezelfde reden kunnen alle DNA-fragmenten ook tezamen in één baan van een geminiaturiseerde gel lopen: de capillaire elektroforese. Aan het uiteinde van het capillair bevinden zich een ultraviolette lichtbron, die de fluorescerende kleurstoffen van de passerende DNA-fragmenten 'aanslaat' en een fotocel, die de resulterende fluorescerende lichtpulsen opvangt en het opgewekte elektrische signaal naar een computer stuurt. Zo is de analyse van de basenvolgorde en de weergave daarvan op een beeldscherm geheel gecomputeriseerd (Figuur VI-36). Op het beeldscherm ziet men tegelijkertijd de basenvolgorde van de twee DNA-strengen van beide allelen van een gen, waarvan het RNA wordt overgeschreven. Zo kan men de voor de prenatale diagnostiek van belang zijnde basenvolgorde in het DNA van de foetus vergelijken met die van de ouders.

Onderzoek naar variaties in het aantal repeats in repeatsequenties

Zoals wij al zagen, bestaat een belangrijk deel van ons DNA uit (hele) korte DNA-sequenties, van twee, drie, vier, maar soms ook (veel) meer basenparen, die in een kortere of langere trein achter elkaar liggen: de **repeat-sequenties**, ook wel **variable number of tandem repeat (VNTR)-sequences** of **short tandem repeats (STRs)** genoemd. Repeat-sequenties bevinden zich in grote aantallen verspreid over alle chromosomen. Elke repeat-sequentie bevindt zich in principe wel steeds op een vaste plaats in een chromosoom. Bij een chromosoompaar bevindt elke repeat-sequentie zich dus ook op precies dezelfde plaats in de homologe chromosomen.

Repeat-sequenties zijn iets gevoeliger voor fouten bij de verdubbeling van het DNA, direct voorafgaande aan de mitotische en meiotische deling en bij de cross-overs tijdens de meiotische deling, dan unieke DNA-sequenties: de verdubbelings- en cross-over-machinerie kan een enkele keer de tel kwijtraken in het te reproduceren en/of te herschikken aantal repeats. Daardoor zijn er onder de mondiale, menselijke bevolking in elke repeat-sequentie in de loop der tijden (en we spreken hier over een evolutionaire tijdschaal van tienduizenden jaren) variaties ontstaan in het aantal repeats, door verlies of aanwas van één of meer repeats: de repeat-sequenties zijn verschillen in lengte gaan vertonen. Omdat er vele duizenden repeat-sequenties zijn, verspreid over alle chromosomen, zijn er ook tussen de homologe chromosomen van elk chromosoompaar verschillen in het aantal repeats van de repeat-sequenties te verwachten. De frequentie van het optreden van bovengenoemde fouten in repeat-sequenties is overigens nog altijd zo klein, dat de kans klein is dat bij een willekeurig ouder-kindpaar een verandering zou zijn opgetreden in de lengte van een repeat-sequentie. Van ouder op kind zijn repeat-sequenties stabiel.



Figuur VI-36. Het huidige beeld van de weergave van **DNA-sequencing** bij de DNA-diagnostiek. Het principe van de sequencing is precies als beschreven in Figuur VI-35, alleen zijn de veranderde nucleotiden gemerkt met een fluorescerende kleurstof: A* = groen; C* = blauw; G* = geel; T* = rood. Daardoor kan men de reactie in één reageerbuis uitvoeren in plaats van simultaan in vier en kan men met één gel voor alle vier nucleotiden volstaan. In dit voorbeeld is in de bovenste twee horizontale rijen met gekleurde piekjes de DNA-volgorde van een controlemonster te zien en in de onderste twee die van een patiënt-monster. De onderste van de twee rijen met de nucleotiden in rechte letters erboven aangegeven, betreft steeds het eerste onderzoek en de bovenste met de nucleotiden in cursief erboven een tweede onderzoek (het eerste en tweede onderzoek moet natuurlijk steeds hetzelfde resultaat laten zien). Helemaal bovenin ziet u de basenvolgorde van het referentie-DNA, waarmee patient- en controle-DNA worden vergeleken. Verder zien we onder de gele band met basen steeds streepjes onder drie basen staan, dit geeft het reading-frame van het betreffende gen aan: daaronder staan de bijbehorende aminozuren (in de korte aanduiding met één hoofdletter, zie Tabel II-I) van het door dat gen gecodeerde eiwit. In dit voorbeeld wordt de basenvolgorde van de 474^e tot en met 534^e base van een bepaald gen weergegeven. De basenvolgorde betreft beide allelen van het gen, dus de twee DNA-strengen, die worden afgelezen. Meestal hebben deze op een bepaalde plaats dezelfde base en dan zien we dat als één piekje van een bepaalde kleur. Wanneer beide exemplaren op een overeenkomstige plaats een verschillende base zouden hebben, dan zien we dat als twee piekjes van verschillende kleur. Dit is het geval in het patiënt-DNA op positie 503: in het verticale, langwerpige kader is te zien dat op deze positie het controle-DNA de base C heeft in beide allelen van het gen, terwijl het patiënt-DNA in de ene kopie een C heeft en in de andere een T. Het referentie-DNA vermeldt hier de base Y: dit betekent dat op deze positie in de bevolking bij gezonde personen zowel een C als een T kan vóórkomen. Y staat voor een 'kleine' base (een **pyrimidine**: C of T), de 'grote' basen A en G worden met de letter **U** (**purine**) aangeduid. Er is hier dus sprake van een **single nucleotide polymorphism (SNP)** (Foto ter beschikking gesteld door Dr. D.J.J. Halley, sectie DNA-diagnostiek, afdeling Klinische Genetica, Erasmus MC, Rotterdam).

Deze stabiele verschillen zijn zeer bruikbaar voor DNA-onderzoek naar het onderscheid tussen het vaderlijke en moederlijke chromosoom van een bepaald chromosoompaar.

Door nu de unieke DNA-sequenties, die een bepaalde repeat-sequentie flankeren, te gebruiken als hybridisatieplaats voor een PCR-primerset, kan men die repeat-sequentie (inclusief zijn flankerende primer-sequenties) van de homologe chromosomen van een chromosoompaar vermenigvuldigen, de verkregen DNA-fragmenten op grootte scheiden en zichtbaar maken.

Men gebruikt het onderzoek van de verschillen in repeatlengtes van een repeat-sequentie voor het vaststellen van de vaderlijke of moederlijke herkomst van chromosomen, zoals wij al eerder in dit hoofdstuk hebben gezien. Een uitgebreidere toepassing hiervan is het met behulp van het onderzoek van verschillende repeats van diverse chromosomen vaststellen van de identiteit van een persoon. Ieder individu heeft zijn eigen unieke patroon van de lengtes van repeats: de **DNA-fingerprint**. Dit onderzoek vindt een enkele keer prenataal plaats.

DNA-fingerprinting

Deze toepassing is vooral bekend geworden door de identificatie van daders van misdrijven aan de hand van DNA-sporen, die zij op de plaats van de misdaad hebben achter gelaten: het **forensisch DNA-onderzoek**. Het profiel van de repeatlengtes van veel repeat-sequenties van het DNA, de **DNA-fingerprint**, van de (veronderstelde) dader wordt vergeleken met de DNA-fingerprints van de aangehouden verdachte(n). Bij een zogenoemde match komen de DNA-fingerprints van de (veronderstelde) dader en (één van) de verdachte(n) overeen: de verdachte kan de dader zijn. Bij geen match, kan dit een verdachte vrij pleiten. Dat de bewijsvoering met behulp van het sporenonderzoek met DNA-fingerprinting nog niet zo eenvoudig is en dat verkeerde interpretaties kunnen leiden tot de veroordeling van onschuldigen, hebben de Schiedamse parkmoord en de Puttense moordzaak wel laten zien. De Deventer-moordzaak heeft laten zien, dat zelfs de aanwezigheid van een DNA-spoor van de voor die misdaad veroordeelde op de kleding van het slachtoffer toch nog veel twijfel kan laten bestaan over diens werkelijke betrokkenheid bij het misdrijf. Forensisch DNA-onderzoek blijkt het klassieke rechercherwerk bij de opsporing, vervolging en berechting niet te kunnen vervangen. Overigens werd dankzij nieuwe wetgeving, die verplicht dat van iedere ernstige delinquent een DNA-monster wordt opgenomen in de forensische DNA-databank, onverwacht voor een tot dan toe in het onderzoek buiten beeld gebleven persoon een match gevonden met DNA-materiaal op het slachtoffer van de Puttense moordzaak. Meer 'oude' zaken blijken trouwens sindsdien nieuwe aanknopingspunten voor onderzoek te bieden.

Het DNA-onderzoek is een enorme aanwinst voor het forensisch onderzoek.

Een andere, bekende toepassing van DNA-fingerprinting is het onderzoek naar bloedverwantschap, zoals dat kan vóórkomen in een zoektocht naar onbekende ouders, kinderen of familieleden, bijvoorbeeld in het televisie-programma ‘Spoorloos’. Een match van adviesvrager en een opgespoord, aspirant familielid bewijst bloedverwantschap, terwijl een mismatch een bloedband uitsluit. In Figuur VI-37 is een voorbeeld van dit type onderzoek te zien: in dit voorbeeld gaat het om onderzoek naar het biologisch vaderschap van een aspirant vader van een kind. Het eerder in dit hoofdstuk besproken onderzoek naar de ‘parent of origin’ van de chromosomen van een bepaald chromosoompaar in vruchtwater of vlokken is feitelijk een beperkte toepassing van deze techniek voor één chromosoompaar.

De toepassing van DNA-fingerprinting in de prenatale diagnostiek vindt eigenlijk alleen plaats voor het onderzoek naar de één- of twee-eiigheid van tweelingen. Theoretisch zou het ook gebruikt kunnen worden voor vaderschapsonderzoek, maar prenataal wordt uiterst zelden vaderschapsonderzoek gedaan. Bij elke prenatale DNA-diagnose wordt overigens wel gebruikt gemaakt van de verschillen in lengte van een aantal repeat-sequenties, om in de vlokken moederlijk van foetaal weefsel te onderscheiden, teneinde eventuele bijmenging van moederlijk weefsel aan het foetale vlokkenweefsel aan te tonen of uit te sluiten.

Bijzondere repeat-sequenties van repeats bestaande uit drie basen: trinucleotiden repeats

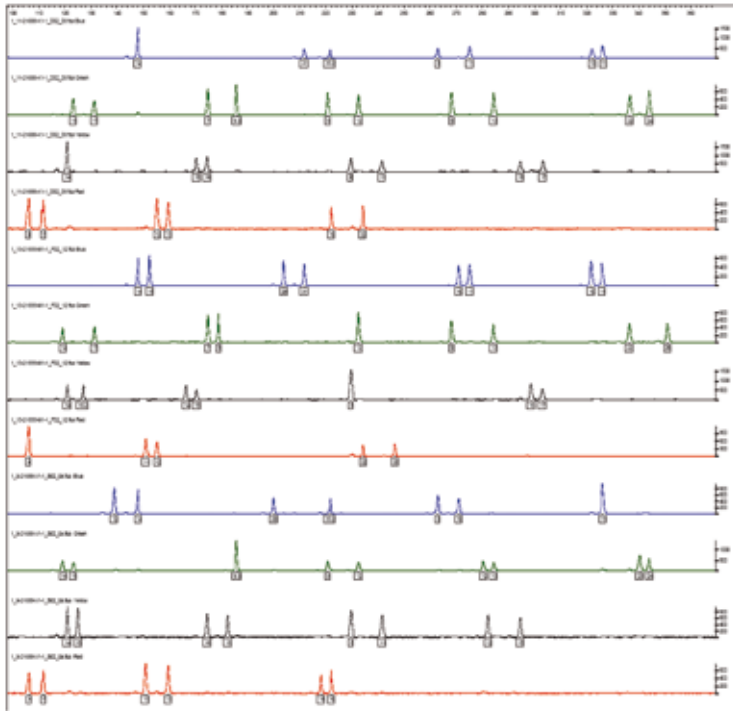
Bijzondere repeat-sequenties zijn die, die uit repeats van drie basenparen (**trinucleotiden-repeat**) bestaan en in de exonen van een gen liggen. Bij een aantal ziektes, zoals de relatief veel voorkomende geslachtsgebonden erfelijke geestelijke achterstand, het **fragiele X-syndroom**, de autosomaal dominant erfelijke spierziekte **dystrophia myotonica** (ziekte van Steinert), de autosomaal dominant erfelijke, op latere leeftijd optredende **ziekte van Huntington** (geestelijke aftakeling en het maken van vreemde, onwillekeurige en ongecoördineerde bewegingen) en bij de verschillende typen van **spinocerebellaire ataxie (SCA)** (op wisselende leeftijd optredende ataxie, regelmatig gepaard gaande met andere neurologische symptomen) spelen trinucleotiden-repeats de hoofdrol in het optreden of niet-optreden van de aandoening. Bij het Fragiele X-syndroom betreft het een **CGG-repeat**, bij dystrofia myotonica een **CTG-repeat** en bij de ziekte van Huntington en de diverse SCA-typen een **CAG-repeat**.

Laten we de situatie bij het fragiele X-syndroom eens wat nader bekijken. Is het aantal CGG's in de repeat-sequentie normaal (gemiddeld rond de 30), maar in ieder geval kleiner dan 55, dan is er niets aan de hand: de repeat is stabiel. In bepaalde families treden evenwel van de ene op de andere generatie toenames in het aantal

Final Report Human Identity Test

Project code:

Biilage 2: Analyseresultaten per monster



Figuur VI-37. Voorbeeld van een **DNA-fingerprint** bij een vaderschapstest. U ziet drie sets van gekleurde lijnen (blauw, groen, zwart en rood) met piekjes. Deze piekjes vertegenwoordigen bepaalde **repeat-sequenties** van verschillende chromosomen: blauw v.l.n.r. de chromosomen 8, 21, 7 en 5

groen v.l.n.r. de chromosomen 3, 11, 13, 16 en 2

zwart v.l.n.r. de chromosomen 19, 12, 2 en 18

rood v.l.n.r. de chromosomen X en Y, 5 en 4

De PCR-producten van de repeat-sequenties zijn gelabeld met vier verschillende kleurstoffjes zodat ze allemaal tegelijk in één proef kunnen worden uitgevoerd. De kleuren van de PCR-producten zijn zo gekozen, dat ze onderling voldoende in grootte verschillen om niet in elkaars vaarwater terecht te komen. Van links naar rechts neemt de grootte van het aantal repeats in de repeat-sequentie toe. De bovenste set zijn van het kind, de middelste van de moeder van het kind en de onderste van de aspirant-vader. Onder elk piekje staat een cijfer dat de variant aangeeft, zoals die bij het betreffende individu is gevonden. Van de twee exemplaren van elke repeat van het kind moet er één bij moeder terug te vinden zijn en de ander bij vader. In dit voorbeeld is dat ook zo, er is sprake van een **match**: de aspirant vader is de biologische vader van het kind. De kans dat een willekeurige, niet-verwante persoon op deze manier te identificeren zou zijn als ouder van het kind is astronomisch klein (Illustratie ter beschikking gesteld door Drs. P.C. Volkers en Drs. B.J. Reichert, Verilabs/BaseClear, Leiden).