

Overzichten

DNA-amplificatie en de analyse van gendefecten

J. A. LENSTRA

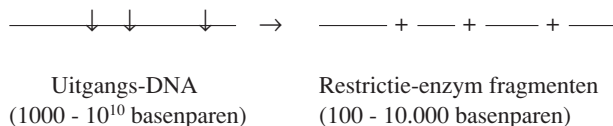
We geven een kort overzicht van de technieken waarmee DNA kan worden onderzocht. De uitvinding van de polymerase kettingreactie (PCR) in 1984 heeft de DNA-technologie toegankelijk gemaakt voor routine-onderzoek. Elk stuk DNA waarvan de volgorde bekend is kan *in vitro* worden vermenigvuldigd. Dit opent ongekennde mogelijkheden voor de genetische en microbiologische diagnostiek, voor nauwkeurige weefseltyperingen en voor de analyse van tumoren. De mogelijkheden die er zijn om in geamplificeerd DNA gendefecten te analyseren worden nader besproken.

De DNA-technologie heeft een revolutie teweeggebracht in de medische en biologische wetenschappen. Het begon in 1973 met de uitvinding van het kloneren van recombinant-DNA. In de daarop volgende jaren werden diverse technieken ontwikkeld om DNA te analyseren en manipuleren. In 1984 volgde de ontwikkeling van de polymerase kettingreactie. Deze heeft de DNA-technologie ook toegankelijk gemaakt voor het routine-onderzoek. Wat zijn de meest belangrijke technieken en hoe kunnen ze worden gebruikt in de klinische chemie?

Enzymen

Aan de basis van de DNA-technologie staat de enzymologie. We beschikken over een heel scala aan enzymen waarmee we het DNA kunnen bewerken. We noemen de allerbelangrijkste:

- Restrictie-enzymen herkennen een bepaalde volgorde, meestal van 4 of 6 basen. Op de plaats van die herkenningsvolgorde wordt het DNA geknipt in gemakkelijk te hanteren fragmenten.

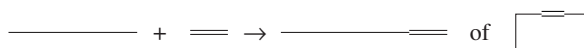


(↓ geeft de herkenningsvolgorde aan waar het enzym knipt.)

Facultair Recombinant-DNA Laboratorium, Faculteit der Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht

Correspondentie: Dr. J. A. Lenstra, Facultair Recombinant-DNA Laboratorium, Faculteit der Diergeneeskunde, Yalelaan 1, 3584 CL Utrecht.

- DNA ligase kan DNA fragmenten juist weer aan elkaar koppelen.



- DNA polymerase synthetiseert een DNA streng. Dit komt verderop ter sprake bij de bespreking van de PCR.

Elektroforese

De hoeveelheid en de lengte van DNA fragmenten kan heel eenvoudig worden bepaald door elektroforese in een gel van agarose of polyacrylamide. De DNA fragmenten bewegen naar de positieve pool, waarbij de korte fragmenten sneller migreren dan de lange. Het DNA kan zichtbaar worden gemaakt door middel van de fluorescerende stof ethidiumbromide.

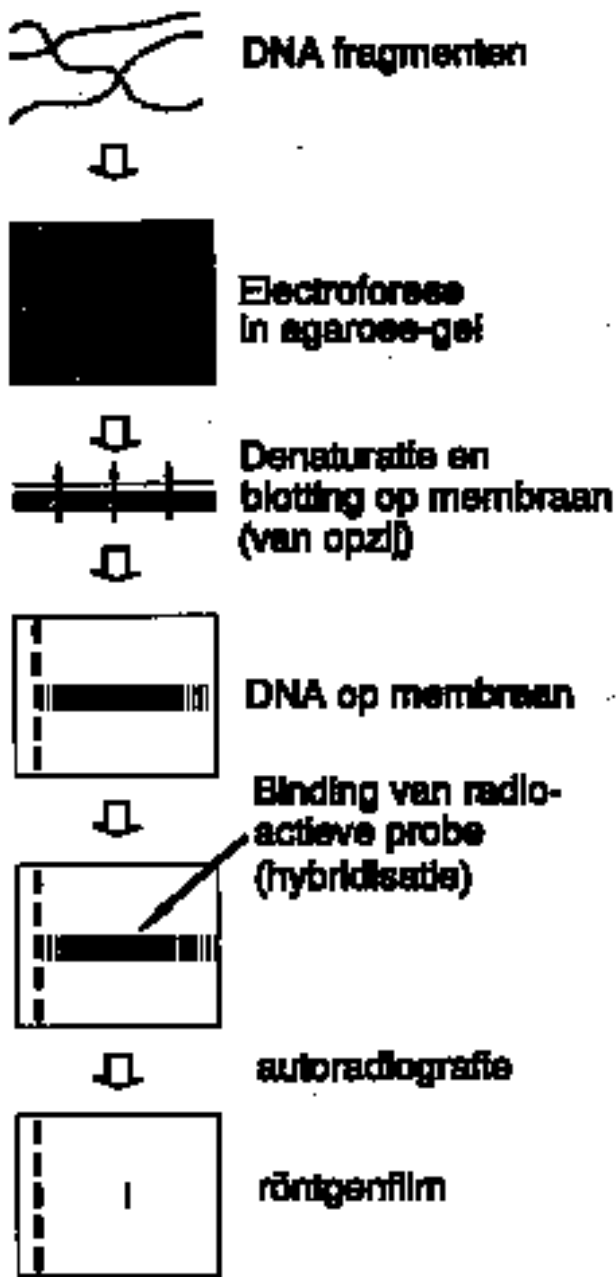
Southern blotting

Het haploïde menselijk genoom heeft een totale lengte van 3 miljard baseparen. Een typische splitsing van 10 µg gezuiverd DNA met een bepaald restrictie-enzym geeft ca. 750.000 verschillende fragmenten. Van elk fragment is dan 10 tot 20 picogram aanwezig. Een dergelijke minieme hoeveelheid kan worden aangetoond met Southern blotting (figuur 1). Eerst wordt het mengsel van fragmenten geëlektroforeerd. Vervolgens worden de DNA-strengen van elkaar gescheiden (denaturatie) en overgebracht van de gel naar een nylon membraan. Het membraan wordt dan geïncubeerd met een specifieke probe. Deze heeft een nucleotidenvolgorde die complementair is met de volgorde van het gezochte fragment en zal dit fragment specifiek binden. Samen vormen ze weer een dubbelstrengs helix (hybridisatie). De probe is radioactief gemerkt en kan worden gelocaliseerd door het membraan op een röntgenfilm te leggen (figuur 1).

Het is mogelijk om erfelijke diagnoses te stellen met Southern blotting. Met genomisch DNA is dit echter zeer bewerkelijk. Een heel nuttige toepassing van de Southern blot is de DNA-fingerprinting. Er wordt dan een probe gebruikt die specifiek is voor variabele stukken DNA (de minisatellieten, zie verderop).

Klonering

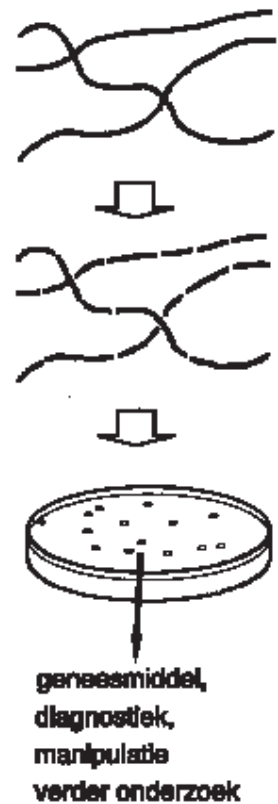
De klonering van recombinant-DNA was tot voor kort de kern van de DNA-technologie. Omdat dit eigenlijk nog steeds meer hoort bij de fundamentele research dan bij de routinematige toepassingen behandelen we het in vogelvlucht (figuur 2). We nemen



Figuur 1. De analyse van DNA door Southern blotting

als voorbeeld de klonering van een menselijk gen. We splitsen dan eerst menselijk DNA met een restrictie-enzym. De honderdduizenden verschillende fragmenten worden vervolgens geligeerd aan vector DNA. Een vector is een stuk DNA (hetzij een bacterieel plasmide, hetzij een bacteriofaag) waaraan een stuk DNA van een ander organisme kan worden gekoppeld (recombinant DNA) en dat bij een bacterieel naar binnen kan worden gebracht. We krijgen dan een verzameling van honderdduizenden bacteriën of faagdeeltjes die elk één bepaald stukje humaan DNA bevatten, een gene library. Groei op agarplaten geeft dan honderdduizenden kolonies (of plaques met bacteriofagen). Elke kolonie bevat een groot aantal bacteriën met hetzelfde stuk humaan DNA: de kloon. Er zijn dan verschillende manieren om de kolonie met het gewenste humane DNA-fragment te selecteren. Als we bijvoorbeeld een fragment uit het menselijke gen voor hemoglobine al in handen hebben, kunnen

1. DNA uit een mens, dier, plant, schimmel, etc.
2. Splitsing met een restrictie-enzym; elk fragment wordt via een vector bij een bacterie naar binnen gebracht
3. Elke kolonie bevat één recombinant-DNA fragment
4. Selectie van de gewenste kolonie
5. Het recombinant-DNA heeft verscheidene toepassingen



Figuur 2. Schematisch overzicht van de klonering van DNA.

we dat gebruiken als probe (net als bij Southern blotting) om alle kolonies die overlappende stukken uit hetzelfde gen bevatten te localiseren. De gezuiverde kloon kan dan voor verschillende doeleinden worden gebruikt.

PCR

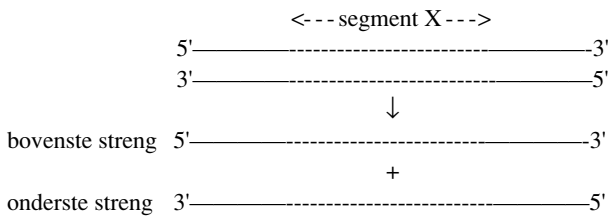
Een klonering kost al gauw een aantal maanden en is dus nog minder geschikt voor de analyse van veel monsters dan Southern blotting. Dit kan wel met de polymerase ketting reactie (PCR), uitgevonden in 1984 en nu al één van de belangrijkste technieken in de moleculaire biologie. Het is misschien symbolisch dat de afkorting PCR met dezelfde letters begint als de afkorting voor personal computer: zoals de PC de computers voor iedereen toegankelijk heeft gemaakt, zo heeft de PCR dit gedaan voor de DNA-technologie. Alle reden om even stil te staan bij het principe van PCR.

Met PCR wordt een stuk DNA in vitro vermenigvuldigd. We gaan altijd uit van de volgende situatie:

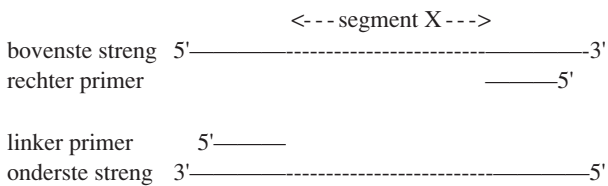
- we zijn geïnteresseerd in een DNA-segment X (100-5000 bp) uit bijvoorbeeld het menselijk genoom en
- we weten op een of andere manier de volgorde links en rechts van segment X, de flankerende sequenties. We synthetiseren dan twee korte stukjes DNA, oligonucleotiden, met een lengte van 20-25 nucleotiden waarvan de volgorde overeenkomt met die flankerende sequenties: de linker complementair aan de onderste streng en de rechter aan de bovenste streng.

De PCR cyclus bestaat dan uit drie stappen:

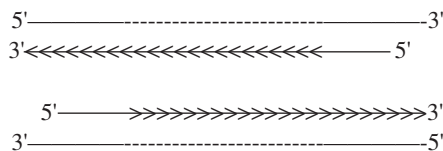
- eerst wordt door denaturatie bij 95 °C beide DNA-strengen gescheiden.



- tijdens de tweede stap binden de oligonucleotiden aan weerszijden van segment X (*annealing* bij 55-60 °C).



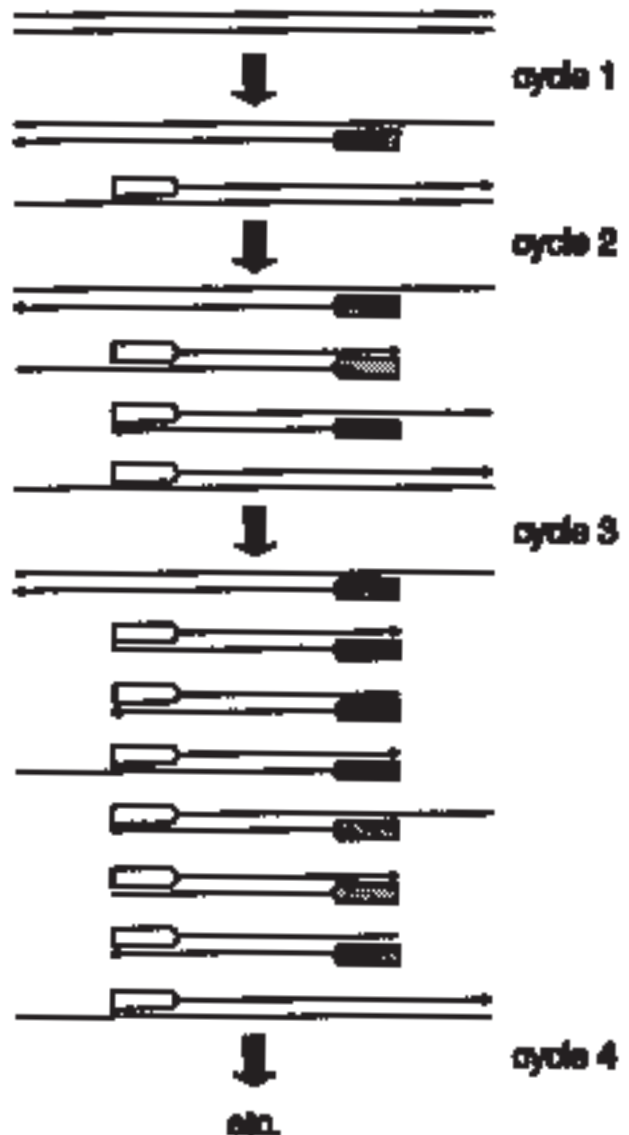
- de derde stap is de extensie bij 72 °C: de oligonucleotiden fungeren als primers van het DNA polymerase. Dit enzym synthetiseert een nieuwe streng door de primers te verlengen complementair aan respectievelijk de bovenste en onderste streng. Het enzym is geïsoleerd uit de bacterie *Thermus aquaticus* (afgekort Taq) uit heetwaterbronnen en werkt het best bij hoge temperatuur.



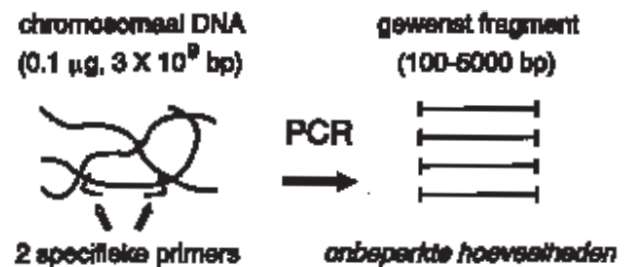
Essentieel is dat verlenging van de ene primer een streng oplevert waaraan de andere primer kan binden en omgekeerd. Als we dan de cyclus van denaturatie, annealing en extensie steeds herhalen, zetten we een kettingreactie in gang, waarbij de hoeveelheid DNA tussen de primers elke keer wordt verdubbeld (figuur 3). Na 30 cycli hebben we voldoende van segment X voor elke denkbare toepassing. In principe is er maar één molecuul DNA nodig om de kettingreactie op gang te brengen!

De praktische uitvoering van de PCR-reactie is zeer eenvoudig. Alle reactiecomponenten (het DNA-monster, buffer, nucleotiden, primers en Taq DNA polymerase) worden bij elkaar gepipetteerd. Het DNA hoeft niet eens erg zuiver te zijn. Vaak kan een cel- of weefsel extract rechtstreeks worden gebruikt. Het totale mengsel wordt geplaatst in een apparaat dat de temperatuur automatisch laat wisselen van 95 °C (denaturatie) naar 55-60 °C (annealing), dan naar 72 °C (extensie) en vervolgens weer van voren af aan. Alle componenten, inclusief het enzym, zijn hittestabiel, zodat de reacties blijven plaatsvinden zonder enig ingrijpen van buiten af.

Het resultaat staat weergegeven in figuur 4. Uitgaande van een kleine hoeveelheid van een complex



Figuur 3. Verdubbeling van DNA tussen primers door opeenvolgende cycli tijdens de polymerase ketting reactie.



Figuur 4. Het concept van de isolatie van een zuiver DNA-fragment uit een complex DNA-monster.

DNA monster (het template) isoleert men zonder al te veel moeite een zuiver stuk DNA. Dit kan dan voor allerlei toepassingen worden gebruikt (1, 2). Zo kan men een stuk DNA van een virus of een bacterie amplificeren om op deze manier de veroorzaker van een infectie aan te tonen. In de klinische chemie zal de PCR meestal worden gebruikt voor het aantonen van een defect of voor weefseltyperingen.

Defecten in DNA

Het DNA als drager van onze erfelijke eigenschappen is geen vast gegeven, maar voortdurend onderhevig aan veranderingen. Als een verandering plaatsvindt in geslachtscellen, kan deze worden doorgegeven aan nakomelingen. Dat kan aanleiding geven tot een aangeboren afwijking. Veranderingen in DNA in weefselcellen zullen meestal onopgemerkt blijven, tenzij het DNA zodanig verandert dat de cel een tumor gaat vormen.

In de afgelopen jaren is de moleculaire basis van een groot aantal erfelijke ziekten opgehelderd. In al deze gevallen is het betrokken gen eerst geïsoleerd door middel van klonering. Vervolgens werd de nucleotidevolgorde bepaald en werd uitgezocht welke verandering in het DNA verantwoordelijk is voor de erfelijke ziekte. Ook zijn er inmiddels een aantal mutaties ontdekt die een rol spelen bij het ontstaan van een tumor. Waaruit bestaan die veranderingen?

- Al heel lang bekend zijn de chromosomale afwijkingen, zoals trisomieën en translocaties. Deze zijn direct onder de microscoop waar te nemen (hoewel het wel degelijk veranderingen zijn op DNA-niveau).
- Aan de andere kant van het spectrum zijn er de puntmutaties, waarbij er één 'letter' (basepaar) veranderd is (figuur 5).
- Als kleine stukjes DNA verloren gaan of juist worden ingevoegd ontstaan er respectievelijk deleties en inserties.
- Een speciaal geval van de laatste categorie zijn de veranderingen in de mini- en microsatellieten. Dit zijn tandem repeats, waarbij een motief van 5 tot 30 baseparen (in minisatellieten) of van 2 tot 4 baseparen (in microsatellieten) een aantal keren achter elkaar herhaald wordt. Het meest komen voor de microsatellieten van het type -CA-CA-CA-CA-. De repeats zitten bij iedereen op dezelfde plaats. Het blijkt dat het aantal keren dat het motief herhaald wordt verschilt per individu, kennelijk omdat de tandem repeats gevoelig zijn voor inserties en deleties.

Aangenomen wordt dat de lengte van de mini- of microsatelliet in de meeste gevallen geen verdere consequenties heeft voor het organisme. Wel kan een bepaalde repeat in de buurt liggen van een heel belangrijk gen dat een rol speelt bij een erfelijke ziekte. Er treedt dan genetische koppeling op: binnen families waarin die ziekte voorkomt zal een

bepaalde lengtevariant steeds overerven samen met het gendefect. De mini- of microsatelliet kan dan worden gebruikt als een indicator voor de mutatie.

Een recente bevinding is dat een aantal erfelijke ziekten, waaronder myotone dystrofie, het fragiele X-chromosoom en de ziekte van Huntington, rechtstreeks veroorzaakt worden door het uitdijen van een speciaal type microsatelliet in een essentieel gen (3), de triplet-repeat, zoals -CGG-CGG-CGG- bij het fragiele X-chromosoom.

DNA diagnostiek

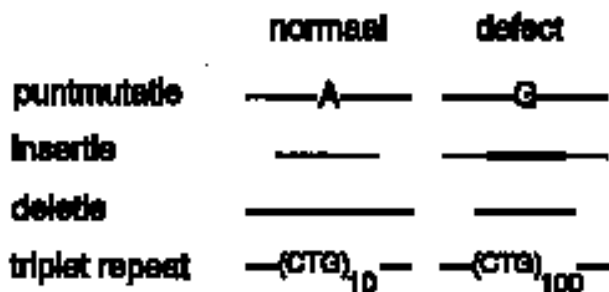
Met PCR kan het DNA-fragment waarin het defect zit worden geïsoleerd. Zonodig kan dit ook gebeuren in een prenataal stadium. Het geamplificeerd DNA kan vervolgens worden getest op de aanwezigheid van een gendefect. Dezelfde technieken worden gebruikt voor een nauwkeurige weefseltypering door de genen die coderen voor de histocompatibiliteitsantigenen te analyseren of voor microbiologische typering, waarbij het genetisch materiaal van een virus of bacterie wordt onderzocht.

De methodologie van de DNA diagnostiek is op dit moment sterk in beweging. De afgelopen jaren zijn verschillende technieken gepubliceerd. (1, 2, 4-8). Een aantal wordt nu al zo veelvuldig gebruikt dat de afkorting waarmee de techniek wordt aangeduid al is doorgedrongen tot het vakjargon. We beperken ons tot een globaal overzicht.

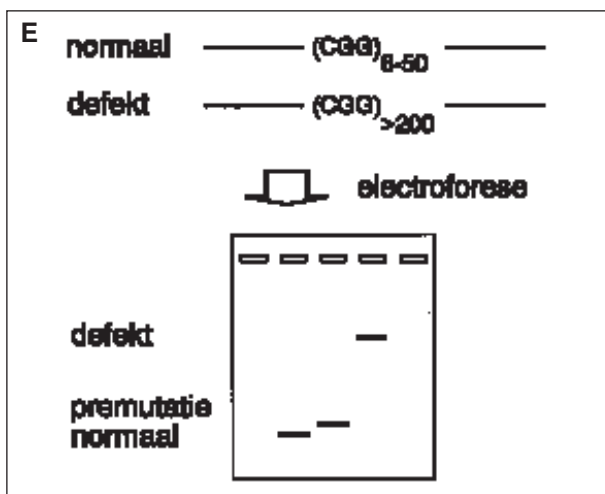
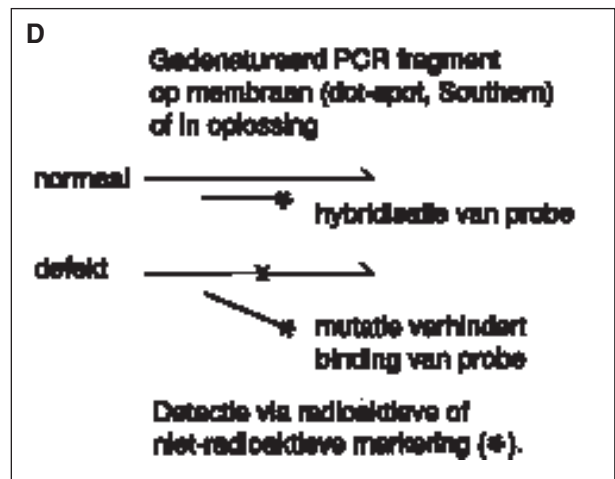
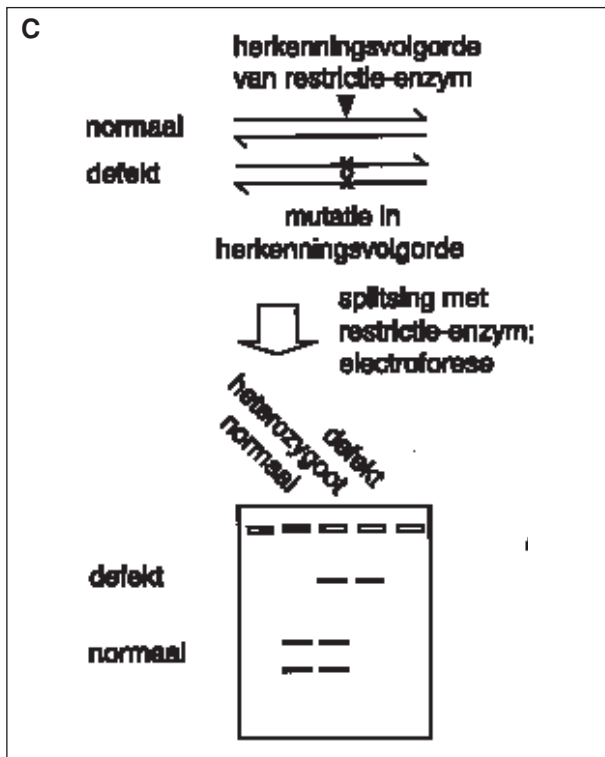
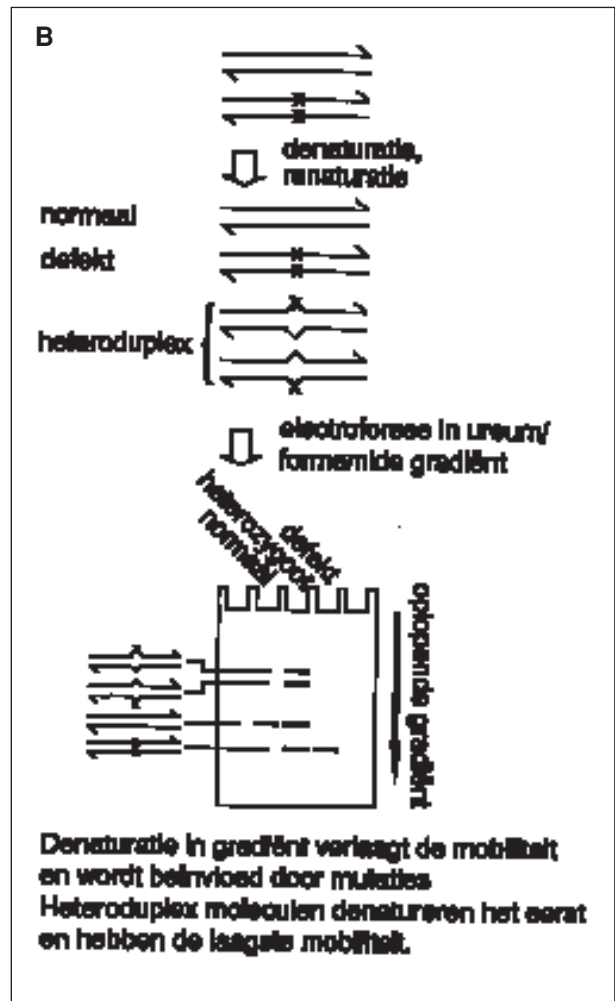
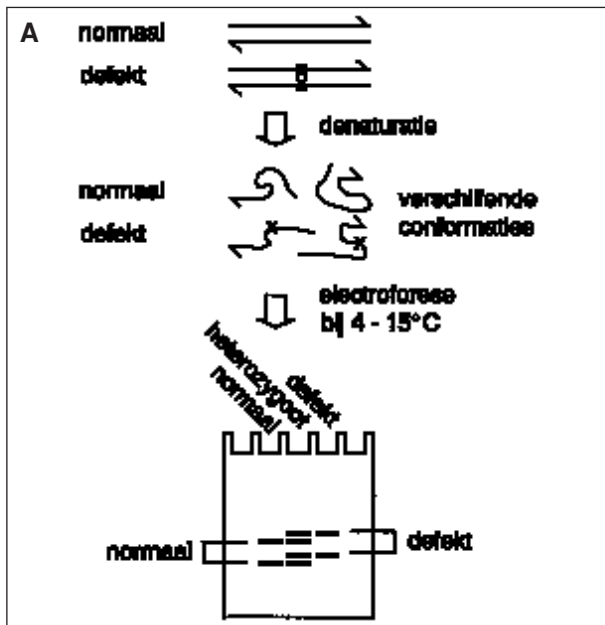
- Het testen op onbekende mutaties.

Heel vaak zijn er in hetzelfde gen een groot aantal verschillende defecten beschreven. Dit geldt bijvoorbeeld voor het genen betrokken bij fenylketonurie en taaislijmziekte en voor de tumor-supressor genen en geactiveerde oncogenen. Het kan natuurlijk ook zijn dat we moeten zoeken naar een nog niet eerder beschreven mutatie. De bepaling van de nucleotidevolgorde (sequencing) van het PCR-fragment levert natuurlijk de meeste informatie op. Dit kan tegenwoordig vrij snel automatisch gedaan worden. Toch zijn twee andere technieken op dit moment meer geschikt voor routine onderzoek.

SSCP (figuur 6a) (7) maakt gebruik van de waarneming dat na opkoken van het PCR-fragment de opvouwing ('conformatie') van de beide enkelstrengs DNA-moleculen wordt beïnvloed door mutaties. Tijdens elektroforese bij lage temperatuur hangt de mobiliteit af van die opvouwing en daardoor ook van de mutaties. Iets meer omslachtig maar nog gevoeliger voor mutaties is de DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (8). Tijdens elektroforese in oplopende concentraties formamide en ureum wordt het DNA geleidelijk gedatureerd en daardoor sterk vertraagd. Mutaties beïnvloeden de snelheid van denaturatie en dus ook de mobiliteit. Als voor de elektroforese een mengsel van geamplificeerd normaal en defect DNA wordt verhit en dan weer wordt afgekoeld, ontstaat ook heteroduplex DNA, hybridemoleculen met een normale en een gemuteerde streng. Deze denatureren tijdens de DGGE eerder dan de homoduplex fragmenten en hebben dan ook een veel lagere mobiliteit (figuur 6b).



Figuur 5. Veranderingen in DNA die een erfelijke ziekte kunnen veroorzaken.



Figuur 6. De detectie van mutaties, inserties en deleties in PCR fragmenten. A: single-chain conformation polymorphism door de afhankelijkheid van de mobiliteit van het enkelstrengs DNA van mutaties in het DNA; B: denaturant gradient gel electrophoresis; het DNA denatureert geleidelijk tijdens elektroforese in een oplopende concentratie formamide. Dit vertraagt de migratie. Door een mutatie denatureert het DNA eerder of later en verandert de mobiliteit. Heteroduplex DNA denatureert sneller en heeft altijd een lagere mobiliteit; C: PCR-restriction fragment length polymorphism door een herkenningsvolgorde van een restrictie-enzym die alleen aanwezig is in normaal of defect DNA; D: allele specific oligonucleotide met een oligonucleotide probe die in dit geval alleen bindt aan het normale DNA; E: directe gel-elektroforese met als voorbeeld de analyse van een triplet microsateeliet.

- Het testen op bekende mutaties.
Als een mutatie de herkenningsvolgorde verandert waar een restrictie-enzym kan knippen wordt vaak gebruik gemaakt van PCR-RFLP. Na de PCR wordt het enzym toegevoegd en afhankelijk van de mutatie wordt het fragment wel of niet geknipt. Dit kan dan rechtstreeks worden getest door gel-elektroforese (figuur 6c).
Bij de allele-specific amplification (ASA) bindt de primer op de plaats van de mutatie. De amplificatie hangt dan af van de aan- of afwezigheid van de mutatie. De ASA kan ook worden uitgevoerd als tweede PCR na de eerste (amplification refractory mutation system, ARMS). Dit wordt wel gebruikt voor weefseltyperingen.
Bij alle tot nu toe genoemde methoden moet het monster uiteindelijk worden geanalyseerd door middel van gel-elektroforese. Vooral bij grote aantallen monsters wordt dit zeer bewerkelijk. Bij de allele-specific oligonucleotide (ASO, figuur 6d) wordt het DNA-fragment enkelstrengs gemaakt door denaturatie, geïmmobiliseerd op een filtermembraan en gehybridiseerd aan een oligonucleotide. Afhankelijk van de mutatie zal de oligonucleotide wel of niet binden. Dit oligonucleotide is radioactief of niet-radioactief gemerkt om de hybridisatie te detecteren. Bij reverse blotting wordt juist het PCR-fragment gemerkt en gehybridiseerd aan geïmmobiliseerde oligonucleotiden.
- Het detecteren van inserties en deleties.
Deze veranderen de lengte van het geamplificeerde fragment en kunnen rechtstreeks worden gedetecteerd na gel-elektroforese. Op deze manier worden de polymorfe mini- en microsatellieten geanalyseerd. Figuur 6e geeft schematisch weer hoe de -CGG- microsatelliet betrokken bij het fragiele-X chromosoom met PCR kan worden geanalyseerd. Hierbij ziet men dat een normaal allel binnen enkele generaties via het premutatie-stadium verandert in een defect allel met honderden CGG triplets.

Vooruitzichten

De techniek staat niet stil. Het bovenstaande overzicht is niet meer dan een momentopname. Om nog sneller veel monsters te kunnen analyseren zijn er al verschillende methoden beschreven waarbij alle han-

delingen worden uitgevoerd in microtiterplaten en waarbij de uitslag kan worden afgelezen via een kleurreactie. Als high-tech variant van de ASO wordt ook gewerkt aan oligochips, waarmee de binding van een DNA fragment aan een groot aantal oligonucleotiden kan worden bepaald.

Deze methoden zijn echter niet zonder meer geschikt als het gedefect bestaat uit een lengteverandering van een triplet microsatelliet, want het normale en het defecte DNA zullen beide met dezelfde oligonucleotiden hybridiseren. Voor snelle en automatische bepalingen biedt dan de capillaire elektroforese perspectieven. De tijd zal moeten leren welke methoden in de praktijk het meest geschikt zijn voor de ziekenhuislaboratoria.

Literatuur

1. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. PCR, a practical approach. Oxford University Press, 1991.
2. Lenstra JA. Applications of PCR in the life sciences. *Cell Molec Biol* 1995; 41; 603-614.
3. Nelson DL, Warren ST. Trinucleotide repeat instability: when and where? *Nature Genet* 1993; 4; 107-108.
4. Landegren U. Detection of mutations in human DNA. *Genet Anal Techn Applic* 1992; 9; 873-877.
5. Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genetics* 1993; 5; 111-117.
6. Bidwell J. Advances in DNA-based HLA-typing methods. *Immun Today* 1994; 15; 303-307.
7. Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR primer: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995.
8. Davies, KE. Genome analysis, a practical approach. IRL Press, Oxford, 1988.

Summary

DNA amplification and the analysis of gene defects. Lenstra JA. Ned Tijdschr Klin Chem 1995; 20: 276-281.

A survey of the DNA techniques is presented. The development of the polymerase chain reaction (PCR) has made the DNA technology accessible for routine testing. Any DNA fragment from which the sequence is available can be amplified *in vitro*. This offers wide perspectives for genetic and microbiological diagnosis, histocompatibility tests and the analysis of mutations in tumors. A number of methods to analyse gene defects in amplified DNA is discussed.

Key-words: PCR, genetic defects, clinical chemistry.