

DNA ONDERZOEK AAN VOGELS

Verschenen in *Vogels* mrt/april 2000 onder de titel "Schudden aan de stamboom van de vogels"

Dit artikel gaat over het DNA-onderzoek zoals het wordt gebruikt bij het maken van stambomen die de verwantschap tussen diverse vogelsoorten laten zien. Hoe vogels aan hun wetenschappelijke naam komen, hebben we in een vorig nummer uitgelegd. In het herfstnummer van vorig jaar besteedden we aandacht aan de manier waarop oervogels afstammen van de reptielen, zoals dat lang geleden in de evolutie gebeurde. Hoe de vogels en de reptielen in één stamboom passen, noemen we "diepe taxonomie". Ook het DNA-onderzoek is geschikt voor een bedrijven van de diepe taxonomie van vogels.

Vogels zijn dinosauriërs

Vroeger was het alleen de paleontoloog die zich bezig hield met diepe taxonomie. Dit deden ze - en doen ze nog steeds - aan de fossielen. De ouderdom van aardlagen kan worden bepaald en de fossiele skeletten worden zorgvuldig vergeleken en bestudeerd, zelfs reconstructies zijn mogelijk. Zo weten we nu dat de vogels afstammen van kleine, vleesetende dinosauriërs die op twee poten achter hagedissen aanrenden, zo'n 150 miljoen jaar geleden.

Langs een geheel andere weg, dus zonder moeizame reizen naar verre landen en beitelen in de rotsen op zoek naar fossielen, kunnen onderzoekers meer te weten komen over de verwantschap. Zij doen dat geheel vanuit het laboratorium, zoals dat van de afdeling Biochemie van de Katholieke Universiteit van Nijmegen. Hier worden wel stambomen gemaakt, maar uitspraken over 'wanneer' bijvoorbeeld de vogels aftakken van de reptielen? "„dat is meer het werk van paleontologen, ons interesseren vooral de eigenschappen van de eiwitten en de veranderingen die daarop in de loop van de evolutie hebben plaats gehad" zegt Prof. dr. Wilfried de Jong bij wie ik een middag te gast ben.

DNA-onderzoek heeft iets magisch, het is een wondermiddel dat schijnbaar overal van pas komt: misdadigers herkennen, schapen kloneren, of de verwantschap tussen diersoorten bepalen. Het DNA (Desoxyribonucleïnezuur, zie figuur) bevat de recepten van de eiwitten waaruit iedere plant en dier bestaat. Bijna alle processen die voor de instandhouding van het leven belangrijk zijn, worden gestuurd door enzymen, dit zijn eiwitten met een bepaalde functie. Sommige stukjes DNA zijn heel oud, en zijn in de loop van de evolutie maar weinig veranderd. Kleine veranderingen in de recepten, de zogenaamde basenvolgorde, maken het mogelijk om de evolutionaire geschiedenis van een vogel af

te lezen en te vergelijken met hetzelfde stuk DNA bij andere vogels, reptielen of zoogdieren. In Nijmegen wordt daarvoor de basenvolgorde voor het oogenseiwit crystalline onderzocht.

Sigarettenpeuken en verse lever

Er zijn er ook variabele stukken DNA die kenmerkend zijn voor één persoon en zijn directe verwanten. Een klein beetje DNA, dat we uit het slijm op een sigarettenpeuk of uit een haartje kunnen halen, is voldoende om dit karakteristieke patroon zichtbaar te maken. Drs Marjon van Dijk, onderzoekster in opleiding (OIO), vertelt mij dat bezoekers zich altijd verbazen over de ontzettend kleine hoeveelheden waarmee gewerkt wordt. Een tiende van het miljoenste deel van een liter slijm is al bruikbaar voor DNA-onderzoek. Marjon is bezig met een proefschrift over de veranderingen in de basenvolgorde in een stuk DNA dat het recept is voor een oogenseiwit (crystalline). Zij wil weten hoe deze veranderingen ontstaan in bepaalde evolutielijnen. Op dit moment werkt zij niet aan vogels, maar aan de onderlinge verwantschappen binnen de zoogdieren. Marjon leidt me rond door het laboratorium en laat zien hoe dit in de praktijk allemaal gaat. Het begint met het zoeken naar geschikte dieren. Voor haar onderzoek had ze een egel nodig. Een zojuist gestorven zieke egel kon ze via de dierenambulance krijgen voor haar onderzoek. "Je moet heel schoon werken met DNA anders kan er een verontreiniging optreden met een ander dier", vertelt ze "je moet heel netjes een klein stukje van de lever af snijden". Dit stukje wordt gehomogeniseerd in

een supermixer. Ik vraag haar of het niet verschrikkelijk moeilijk is om uit deze bloederige prut, zuiver DNA te halen. Dankzij de biotechnologie is de praktijk heel simpel. Ze laat me een doosje met flesjes en kleine plastic filterdopjes zien. Aan de prut worden bepaalde chemicaliën uit de verschillende flesjes toegevoegd en dit mengsel wordt voorzichtig over de filterdopjes gedruppeld. Het DNA blijft achter op het filter, zo eenvoudig is het nu! Dit gebeurt in een laboratorium zoals dat er oppervlakkig gezien al honderd jaar uit ziet. Ruime tafels met in het midden een verhoging met honderden flesjes en ander glaswerk. Alleen computers van buiten bedrieglijk eenvoudig uitzijnde kastjes met afleesscherm-pjes, geven het laboratorium een eigentijds gezicht.

Een miljoen kopieën

Uit het ruwe DNA moet een klein stukje veelvuldig gekopieerd worden. Hieraan gaat veel studie vooraf, want er is al veel bekend. Het stukje DNA wordt uit het totale DNA opgespoord via de zogenaamde PCR-techniek. Dit is een kettingreactie waarbij één bepaald stukje DNA zichzelf miljoenen malen kopieert. Daarna beschikt de onderzoeker over een oplossing met voldoende moleculen van dit stukje DNA. Dit is niet eenvoudig; de toepassing van de diverse technieken kost de onderzoeker flink wat kopzorg, want er kan veel misgaan. Dagen en weken werk kan overbodig worden als blijkt dat de onderzoeker niet het begeerde stukje DNA in handen heeft. Het aflezen van de code, de volgorde van de bases lijkt eenvoudig. Daarvoor is weer een misleidend

simpel ogend, maar zeer ingenieus apparaat, een "cycle sequencer". Na enige voorbewerkingen verschijnen buiten op een schermje vier lijntjes rood, geel, groen en blauw. De vier lijntjes vertonen piekjes op de plaats waar een base zich bevindt, de kleur geeft aan welke base waar zit. Een PC registreert het eindresultaat.

Het eindproduct van dagen en weken zoeken en experimenteren is de basenvolgorde, het "recept" voor het ooglenseiwit, een rijtje A, C, G en T's. Zoets als CTCCTGAAGAT..., maar dan honderden letters lang. Van een aantal verschillende vogelsoorten wordt zo de basenvolgorde bepaald van het recept voor het eiwit crystalline. Daarna kan het werk aan de stamboom beginnen. Vogelsoorten waarvan de basenvolgorde weinig verschilt, zijn sterk met elkaar verwant. Grote verschillen wijzen op meer afstand binnen de stamboom. Een ver verwante diersoort –maar die ook weer niet te ver wordt gekozen als zogenaamde outgroup. Dat kan een krokodil, een schildpad (beide reptielen), een muis of de mens zijn, maar geen slak (weekdier) of een bromvlieg (insekt). De verschillen tussen de basenvolgorden worden uitgedrukt in getallen. Een computer gebruikt deze getallen om afstanden binnen de stamboom te berekenen. Dit klinkt eenvoudiger dan het is. Er bestaan diverse methoden van getallen toekennen aan de verschillen tussen de basenvolgorden. Bovendien kan het berekenen van de afstanden binnen de stamboom ook weer op verschillende manieren. Marjon laat me zien hoe de computer rekent en fraaie stambomen op het scherm

laat verschijnen. Wat de PC echter niet kan is het maken van keuzes tussen de verschillende verwerkingsmethoden. Hierbij komt het aan op de kennis, het inzicht en de creativiteit van de onderzoeker.

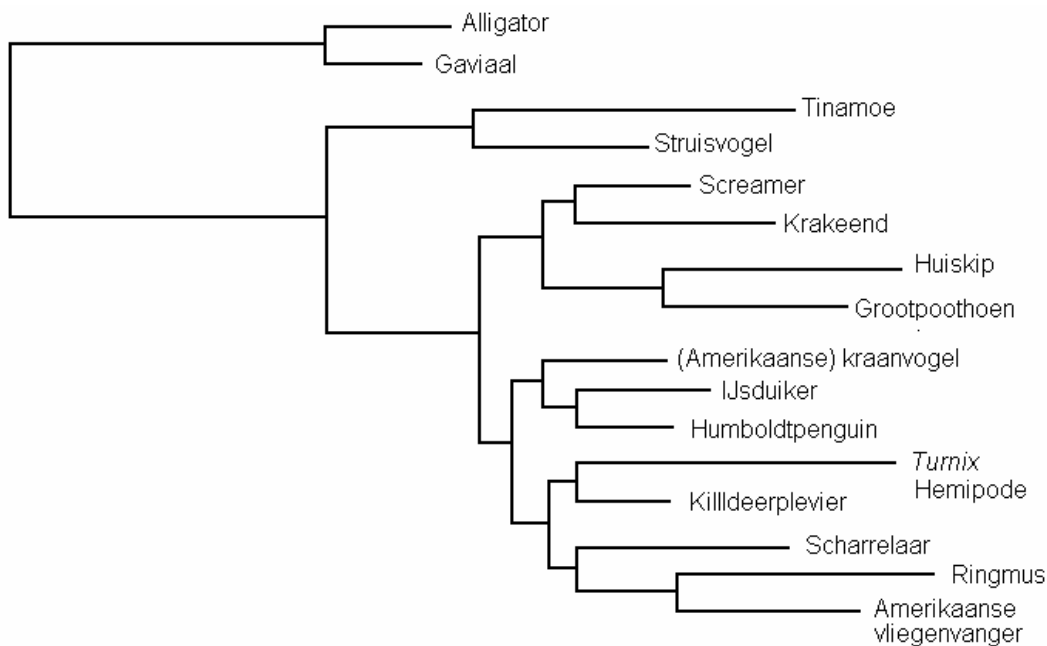
Eenden en hoenders voorop

Veel DNA-onderzoek aan vogels is verricht in de jaren zeventig en tachtig met de zogenaamde hybridisatietechniek. Vooral de Amerikaanse ornitholoog Charles G. Sibley werd hierdoor bekend. Het DNA-onderzoek heeft de laatste tien jaar echter een enorme ontwikkeling gekend. "De door Sibley gebruikte hybridisatietechniek is verouderd", zegt De Jong. "Deze techniek is sterk afhankelijk van de manier waarop die in een bepaald laboratorium wordt uitgevoerd".

Sibley, die in 1998 overleed, ontwierp –samen met een team van andere onderzoekers– in de jaren tachtig een geheel nieuwe stamboom van de nu levende vogels. Deze stamboom week sterk af van wat we gewend waren. De meeste veldgidsen, zoals die van Lars Jonsson, gaan nog uit van een ouderwetse stamboom, de zogenaamde Wetmore-order. Iedereen die vaak een vogelboek ter hand neemt kent deze wel. De duikers en futen staan voorin, de zangvogels achterin. De spechten staan dichtbij de zangvogels. In de stamboom van Sibley cs. stonden de spechten echter voorin; de stormvogels en de duikers kwamen nu in de buurt van de zangvogels. Voorin hoorden volgens Sibley c.s. de eendachtigen en de hoenders. De pas uitgekomen "Avifauna van Nederland" laat schoorvoetend zijn lezers aan deze volgorde wennen. In plaats van de duikers en de fu-

ten, worden de zwanen, ganzen en eenden het eerst behandeld. Verder zijn er hier geen concessies

gedaan en blijft de volgorde vertrouwd, maar dit zal niet lang meer duren.



In tegenstelling tot Sibley's methode, zijn de moderne DNA- technieken goed na te doen in andere laboratoria. Hierdoor kunnen ver- fijningen worden aangebracht. Wilfried de Jong laat me een artikel zien uit 1999 dat gaat over de stamboom van vogels ten opzichte van de krokodillen aan de hand van een heel bepaald stukje DNA. De loopvogels zoals de struisvogels takken het eerst af, na de afsplit- sing van de reptielen. De tinamoes, een groep van Zuid-Amerikaanse hoederachtige vogels, blijken veel meer verwant met de loopvogels dan met de echte hoenders als de kip en het grootpoothoen. Uit dit onderzoek blijkt dat de eendachtigen en hoenderachtigen samen vroeg aftakken van de rest van de groep. Wilfried wijst me op iets heel bijzonders in dit onderzoek.

De rest van de vogels, dus na de aftak van de eenden en de hoen- ders, blijken allemaal een 'gat' te hebben in het onderzochte stukje DNA. Zo'n relatief groot gat kan zeker geen toeval zijn; alle onder- zochte soorten na de aftak hebben het. Dit gat is bij een gemeen- schappelijke voorouder ontstaan en daarna tientallen miljoenen jaren overgedragen.

Hoatzin een hoen?

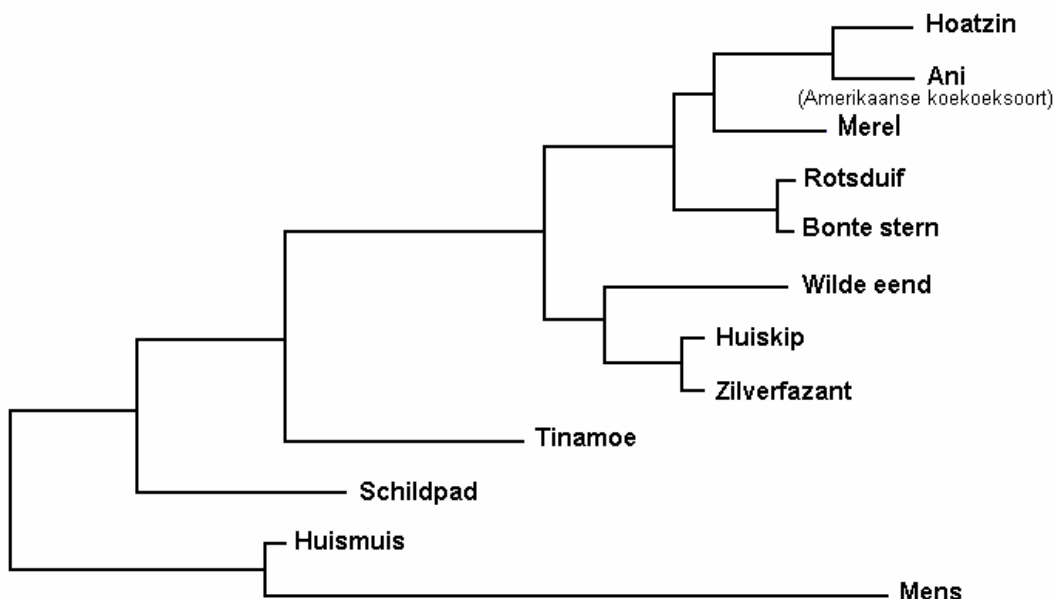
Wilfried de Jong en zijn medewer- kers, zijns direct betrokken ge- weest bij het onderzoek naar de afstammingsgeschiedenis van de hoatzin. De hoatzin is een bijzon- dere vogel uit Zuid-Amerika met een paar zeer eigenaardige ken- merken. Het is een planteneter met een enorme krop die werkt als het

magenstelsel van een koe. Geen enkele vogel heeft dat. Jonge hoatzins hebben klauwtjes aan hun vleugels en lijken daarmee op de oervogels Archeopteryx en de Chinese oervogel. Alle reden om deze vogel nader te bekijken.

Klassieke taxonomen deelden de hoatzin in bij de hoenderachtigen. Geen gekke keuze want daar lijkt de vogel oppervlakkig op, bovendien blijkt juist uit het DNA-onderzoek dat de hoenders een relatief vroege aftak zijn van de stamboom, dus wellicht primitiever en dichterbij de reptielachtige oervogels met hun klauwtjes aan de vleugel. Echter, het DNA-onderzoek van Sibley wees al de andere kant uit: de hoatzin hoort niet bij de hoenderachtigen. Ook uit het onderzoek aan het oogenseiwit crystalline blijkt dat de hoatzin ver van de hoenders afstaat. We moeten het meer in de richting van de zangvogels zoeken, maar niet helemaal. De hoatzin zit dicht bij de

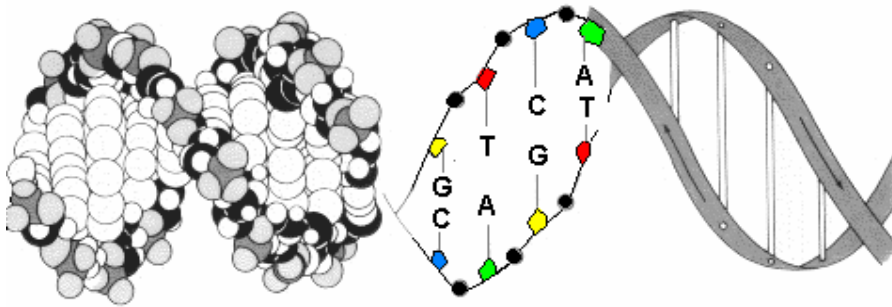
Amerikaanse koekoekachtigen, de ani's (zie afbeelding tweede stamboom). Dit onderzoek werd in 1995 in een Amerikaans vakblad gepubliceerd. Het onderzoek had de zegen van Charles Sibley; hij was medeauteur. Nog recenter onderzoek, nu aan weer een ander stukje DNA plaatste de hoatzin dichterbij een groep van Afrikaanse koekoekachtigen, de turaco's.

Dit is ook typisch voor het DNA-onderzoek. De resultaten zijn niet altijd zo eenduidig. De veranderingen in het DNA gaan niet geleidelijk in de loop van de tijd en deze mutaties laten zich moeilijk omrekenen naar miljoenen jaren evolutiegeschiedenis. Echter, het DNA is een reusachtig groot archief dat eigenlijk pas kort geleden ontsloten is, dankzij de biotechnologie. Waarschijnlijk wachten ons nog tal van verrassingen.



Wat is DNA?

DNA is de afkorting van de Engelse naam voor het molecuul Desoxyribonucleïnezuur, een stof uit de celkern. Genen zijn stukjes DNA. De bouw en functie van het molecuul verklaren hoe de celkern de erfelijke informatie bewaart en doorgeeft. In het DNA zitten de recepten verborgen voor eiwitten of enzymen. De ingrediënten voor eiwitten zijn verschillende type aminozuren. Het recept voor een eiwit bestaat uit een reeks zogenaamde basenparen, voor te stellen als kralen groen, blauw, geel en rood. Groen staat altijd tegenover rood en geel altijd tegenover blauw (zie afbeelding). Een rijtje van drie basenparen bevat de code (bijvoorbeeld GTC) voor één type aminozuur, een ingrediënt dus van het recept voor een eiwit of enzym.



T = Thymine (rood)
G = Guanine (geel)
C = Cytosine (blauw)
A = Adenine (groen)

Het DNA molecuul op drie verschillende manieren weergegeven. Van links naar rechts: de afzonderlijke moleculaire bouwstenen, als schema met de basenparen en als schema met twee strengen