

Micromethodology for the characterization of hemoglobin variants

Citation for published version (APA):

Plaseska, D. (1994). *Micromethodology for the characterization of hemoglobin variants*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19940428dp>

Document status and date:

Published: 01/01/1994

DOI:

[10.26481/dis.19940428dp](https://doi.org/10.26481/dis.19940428dp)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 2

SUMMARY

A major aim of the studies reported in this dissertation is to demonstrate the usefulness of the HPLC techniques and gel methodology for the characterization of rare Hb variants, and to contribute to our understanding of molecular mechanisms that are responsible for the occurrence of these unusual Hb abnormalities.

A review of the literature is presented in Chapter 1 and includes a description of structure and structure-function relationships of the Hb molecule, organization and fine organization of the globin genes, and their developmental expression. General characteristics of the normal human Hb, including those predominantly present in the embryo, the fetus, and newborn baby, as well as that in the normal adult, are presented. This chapter also contains a summary of the molecular events responsible for the occurrence of various Hb variants. Most abnormal Hb have occurred as a result of mutations in the coding regions of the globin genes that change the sequence. Thus, most of the abnormal Hb are characterized by single amino acid substitutions, but some have two amino acid substitutions within the same chain, or have longer or shorter chains. Others are fusion or split Hb that have arisen through processes such as chromosomal translocation. Clinically significant variants are presented separately; they are classified in four groups: the Hb S syndrome, the unstable Hb resulting in hemolytic anemia in the carriers, the Hb with high O₂ affinity leading to erythrocytosis, and the Hb with low O₂ affinity and Hb E variant, both leading to congenital cyanosis. An updated alphabetical list of known Hb variants is provided as an appendix to this chapter.

SUMMARY

The methodologies used for the identification of the Hb variants described in this dissertation are presented in Chapter 2.

Chapter 3 concerns the identification of low oxygen affinity Hb. Chapter 4 describes the characterization of a new Hb variant with an Asn-102 substitution at position 178. The variant Hb Denmark, was detected in 40 donors of a donor family. With a series of variants of the type Hb S₁₇₈Asn, followed by the separation of the individual fragments in reversed phase HPLC, and amino acid sequence analysis of a few of these fragments, greatly facilitated the identification of this substitution. Asn-102 is not involved in any water contact with the heme group of either alpha or beta subunits, and its replacement by another amino acid is not likely to affect Hb stability; carriers of Hb Denmark are therefore not expected to be clinically affected.

The second observation of the Hb S₁₇₈Asn family is described in Chapter 5. The variant was collected in a Mediterranean region and with clinical and hematological features of sickle cell anemia. The identification of this variant would have been virtually impossible without HPLC; the only definitive indication for the presence of an abnormal Hb was the small extra peak on the reversed phase HPL chromatogram. The preparative reversed phase HPLC permitted the isolation of the

CHAPTER 9

SUMMARY

A major aim of the studies reported in this dissertation is to demonstrate the usefulness of the HPLC techniques and DNA methodology for the characterization of rare Hb variants, and to contribute to our understanding of molecular mechanisms that are responsible for the occurrence of some unusual Hb abnormalities.

A review of the literature is presented in Chapter 1 and includes a description of structure and structure-function relationship of the Hb molecule, organization and fine structure of the globin genes, and their developmental expression. General aspects of the normal human Hb, including those predominantly present in the embryo, the fetus, and newborn baby, as well as that in the normal adult, are presented. This chapter also includes a summary of the molecular defects responsible for the occurrence of known Hb variants. Most abnormal Hbs have occurred as a result of mutations in the coding regions of the globin genes that change the sequence. Thus, most of the abnormal Hbs are characterized by single amino acid substitutions, but some have two amino acid substitutions within the same chain, or have longer or shorter chains. Others are fusion or hybrid Hbs that have arisen through crossovers between misaligned chromosomes. Clinically significant variants are reviewed separately; they are classified in four groups: The Hb S syndromes, the unstable Hbs resulting in hemolytic anemia in the carriers, the Hbs with high O₂ affinity leading to erythrocytosis, and the Hbs with low O₂ affinity and Hb M variants, both leading to congenital cyanosis. An updated alphabetical list of known Hb variants is provided as an addendum to this chapter.

The methodologies used for the identification of the Hb variants described in this dissertation are presented in Chapter 2.

Chapter 3 concerns the identification of two α chain variants by HPLC. Chapter 3a describes the characterization of a new Hb variant with an Asp \rightarrow His substitution at position α 78. The variant, Hb Davenport, was detected in two members of a Caucasian family. Mild acidic hydrolysis of the large α T-9 peptide, followed by the separation of the resulting fragments by reversed phase HPLC, and amino acid sequence analysis of a few of these fragments, greatly facilitated the identification of this substitution. Asn α 78 is not involved in any major contact with the heme group or between globin subunits, and its replacement by another amino acid is not likely to affect Hb stability; carriers of Hb Davenport are therefore not expected to be clinically affected.

The second observation of the Hb Sun Prairie [α ₂130(H13)Ala \rightarrow Pro β 2] anomaly is described in Chapter 3b. The variant was detected in a 20-year-old Indian male with clinical and hematological features of chronic hemolytic anemia. The identification of this variant would have been virtually impossible without HPLC; the only definitive indication for the presence of an abnormal Hb was the small extra peak on the reversed phase HPL chromatogram. The preparative reversed phase HPLC permitted the isolation of the

abnormal chain in pure form. Dot-blot hybridization analysis of the amplified $\alpha 2$ - and $\alpha 1$ -globin genes, using CD 130 Ala and CD 130 Pro oligonucleotide probes, localized the G→C substitution in the $\alpha 2$ -globin gene. The study provided the interesting observation that the α -Sun Prairie chain has a greater affinity for the δ chain than for the β chain.

The characterization of two new β chain variants by HPLC is presented in **Chapter 4**. **Chapter 4a** deals with the identification of Hb Iowa, which was observed in a Black infant and her mother. The baby was also heterozygous for Hb S. Structural characterization through amino acid analysis of tryptic peptides of the AE- β^X chain showed a Gly→Ala substitution at position $\beta 119$ (GH2). The replacement of the $\beta 119$ Gly does not affect the function of the Hb molecule, despite its involvement in molecular contacts between the $\alpha 1$ and $\beta 1$ chains.

The use of IEF, cation exchange HPLC, and reversed phase HPLC for screening Hb abnormalities has led to the detection of a new β chain variant, namely Hb Zengcheng. The identification of this variant is described in **Chapter 4b**. Hb Zengcheng [$\alpha 2\beta 2114$ (G16)Leu→Met] was observed in a Chinese newborn. The leucine residue at position $\beta 114$ is internally located and is not involved in any major contact with the heme or globin chains; the Leu→Met replacement is not expected to alter the physicochemical or functional properties of the variant.

Chapter 5 concerns the detection of two unstable β chain variants. Their identification was made by both protein and DNA analyses. Hb Yokohama or $\alpha 2\beta 231$ (B13)Leu→Pro, was observed in a young boy from the former Yugoslavia, who presented with a severe transfusion-dependent hemolytic anemia. The detection of this Hb variant by reversed phase HPLC is presented in **Chapter 5a**. Its characterization was by HPLC analyses on material obtained by high salt precipitation and by direct sequencing of amplified DNA. The detection of Hb Volga or $\alpha 2\beta 227$ (B9)Ala→Asp in a 5-year-old boy from Bosnia and Hercegovina, who suffered from severe hemolytic anemia, is presented in **Chapter 5b**. The variant was observed by reversed phase HPLC and the structural characterization was by HPLC analysis. An easier approach for the detection of the Hb Volga mutation by Ava II digestion of amplified DNA is also described. The patients with Hb Yokohama and Hb Volga were born to healthy parents, without a Hb abnormality. Paternity studies included an evaluation of the polymorphisms of the HLA DQ α locus and provided data that confirmed a de novo mutation in both patients.

Chapter 6 describes the detection of three new γ chain variants, and their characterization by HPLC. Preparative reversed phase HPLC allowed the isolation of the abnormal γ chains in pure form, thus greatly facilitating their characterization. During a survey of cord blood samples from healthy Chinese newborns, a new A_γ variant was detected. The structural characterization of this abnormal variant, named Hb F-Jiangsu, is presented in **Chapter 6a**. Structural analyses of the isolated A_γ^X chain demonstrated a Val→Met substitution at position $A_\gamma 134$, thus creating a rather unique Met-Met sequence. The location of the second methionine residue in the $\gamma T-15$ peptide significantly influences the chromatographic properties of the abnormal A_γ chain. The identification of Hb F-Catalonia or $\alpha 2\gamma 215$ (A12)Trp→Arg is presented in **Chapter 6b**. The variant was observed in

two Spanish babies. Different HPLC procedures allowed the identification of the Trp→Arg substitution in only a minute quantity of the G_{γ}^X chain. **Chapter 6c** describes the structural characterization of Hb F-Brooklyn. The variant was detected in a 2-month-old Caucasian female during a routine screening of blood samples from newborn babies. The variant was detectable on IEF, cation exchange HPLC, and reversed phase HPLC. Structural analyses identified a Lys→Glu substitution at position $G_{\gamma}66$. It is not yet known whether the substitutions observed in these three new γ chain anomalies have any effect on the functional or physicochemical properties of the variants; such studies were not possible due to lack of material.

Chapter 7 presents the identification of the unstable Hb Montreal with a deletion of three amino acid residues (Asp, Gly, Leu) at positions 73, 74, and 75 of the β chain, and an insertion of four different residues (Ala, Arg, Cys, Glu) at the same location. The variant was observed in a 7-year-old boy suffering from a moderate hemolytic anemia. The parents of the boy and two of his siblings were normal. The introduction of an extra amino acid residue, and of the changes in the crevice where the heme pocket is located, is the likely cause of the instability of this abnormal Hb. The above listed changes were detected by analyzing the tryptic peptides of the β -Montreal chain by direct sequencing of amplified DNA, and through hybridization of amplified DNA to specific oligonucleotide probes. DNA sequence analysis allowed the prediction of the likely mechanism(s) responsible for the occurrence of this unusual variant. It is suggested that a mispairing involving the repetitive AGTG sequence at CDs 66 and 67 and at CDs 72 and 73 of the normal β gene caused a duplication of a 16 bp segment, while a deletion of 10 nts due to recombination or slippage, followed by a second short (3 bp) deletion during DNA repair could have resulted in the Hb Montreal anomaly.

The extensive progress made in the studies of Hb variants was made possible primarily because of the development of more sensitive and rapid methods for their detection and characterization. Some of the more important methodological achievements in the studies of Hb variants are briefly reviewed in **Chapter 8**. Different electrophoretic and chromatographic techniques have been developed in the past; they have played an important role in the detection and characterization of numerous Hb variants. Because of their altered electrophoretic properties most of the common Hb variants were detected some 20 to 30 years ago. The Hb variants that have been described in recent years are rare abnormalities, and often have mutations that are difficult to detect by electrophoretic procedures or have a rather complex structure. Advanced methodologies such as HPLC procedures and DNA analyses are required for their characterization.

Currently, IEF, cation exchange HPLC, and reversed phase HPLC are the methods of choice for the initial detection and quantitation of Hb variants. Reversed phase HPLC for peptide analyses is a most useful technique for structural characterization of abnormal Hbs at the protein level, but will be replaced by sequencing of amplified DNA involving the α -, β -, δ -, or γ -globin genes. The identification of Hbs with more complex structures and with distinct physicochemical properties will depend completely on the application of DNA methodology.

CHAPTER 10

SAMENVATTING

Een hoofddoel van de studies, die in dit proefschrift worden beschreven, is de geschiktheid aan te tonen van HPLC-technieken en DNA-methodologie bij het karakteriseren van zeldzame Hb-varianten, en bij te dragen tot een beter begrip van de moleculaire mechanismen, die verantwoordelijk zijn voor het optreden van enkele ongewone Hb-abnormaliteiten.

In Hoofdstuk 1 wordt een overzicht van de literatuur gegeven en ook wordt de structuur en het structuur-functie verband van het Hb-molecule beschreven. Bovendien wordt de organisatie en de fijn-structuur van de globine-genen beschreven, en hoe de genetische informatie tot uitdrukking wordt gebracht. Algemene aspecten van normaal humaan Hb worden gepresenteerd, inclusief de belangrijkste aspecten van Hb afkomstig van de embryo, de foetus, de pasgeborene baby en de volwassene. In dit hoofdstuk wordt bovendien een samenvatting gegeven van de moleculaire defecten welke verantwoordelijk zijn voor het voorkomen van bekende Hb-varianten. De meeste abnormale Hb's zijn het gevolg van een mutatie in de coderende gebieden van de globine genen, waardoor de volgorde is veranderd. Daarom worden de meeste abnormale Hb's gekarakteriseerd door een enkele aminozuur substitutie, maar enkele hebben twee aminozuur substituties in dezelfde keten, of hebben een langere of kortere keten. Andere zijn fusie of hybride Hb's die zijn ontstaan door cross-overs van chromosomen. Klinische belangrijke varianten worden apart besproken. Een indeling in vier klassen is gemaakt: de Hb S syndromen, de onstabiele Hb's, waardoor de dragers hemolytische anemie oplopen, de Hb's met hoge affiniteit voor O₂ hetgeen leidt tot erythrocytosis, en tenslotte de Hb's met lage affiniteit voor O₂ en de Hb M varianten, die beide congenitale cyanosis veroorzaken. In een bijlage van dit hoofdstuk wordt een bijgewerkte alfabetische lijst gegeven van bekende Hb-varianten.

De methodologie, die in dit proefschrift wordt gebruikt bij de identificatie van de Hb-varianten, wordt in Hoofdstuk 2 beschreven.

Hoofdstuk 3 behandelt de identificatie van twee α -keten varianten door HPLC. In Hoofdstuk 3a wordt de karakterisering van een nieuwe Hb-variant met een Asp→His substitutie op positie $\alpha 78$ beschreven. De variant, Hb Davenport, werd aangetoond in twee leden van een blanke familie. De identificatie van deze substitutie werd zeer vergemakkelijkt door gebruik van zwak-zure hydrolyse van de grote $\alpha T-9$ peptide, gevolgd door scheiding van de gevormde fragmenten door reversed-phase-HPLC en analyse van de aminozuur volgorde van enkele van deze fragmenten. Het asparagine residu op de $\alpha 78$ positie is niet betrokken bij enig belangrijk contact met de haem-groep of tussen globine sub-eenheden, en zijn vervanging door een ander aminozuur beïnvloedt waarschijnlijk niet de Hb-stabiliteit; dragers van Hb-Davenport hebben daarom naar verwachting geen klinische symptomen.

De tweede waarneming van de Hb-Sun Prairie [$\alpha_2 130(H13)Ala \rightarrow Pro\beta_2$] anomalie wordt in Hoofdstuk 3b beschreven. De variant werd aangetoond in een 20-jarige manlijke Indiaan met klinische en hematologische karakteristieken van chronische hemolytische anemie. De identificatie van deze variant zou praktisch onmogelijk geweest zijn zonder HPLC; de enige definitieve aanwijzing dat het Hb abnormaal was, was de kleine extra piek op het reversed-phase-HPL-chromatogram. Met preparatieve reversed-phase-HPLC was het mogelijk de

abnormale keten in zuivere vorm te isoleren. Met dot-blot hybridisatie analyse van de vermeerderde α_2 - en α_1 -genen en gebruik van CD 130 Ala en CD 130 Pro oligonucleotide probes was het mogelijk de G→C substitutie in het α_2 -globine gen aan te tonen. De studie leidde tot de interessante waarneming dat de α -Sun Prairie keten een grotere affiniteit heeft voor de S keten dan voor de β -keten.

De karakterisering van twee nieuwe β keten varianten door HPLC wordt in Hoofdstuk 4 gepresenteerd. Hoofdstuk 4a behandelt de identificatie van Hb-Iowa, dat werd aantroffen in een neger kind en haar moeder. De baby was ook heterozygoot voor Hb S. Structurele karakterisering door middel van aminozuur analyse van tryptische peptiden van de AE- β^X -keten toonde aan, dat er een Gly→Ala substitutie was opgetreden op positie $\beta 119$ (GH2). De vervanging van $\beta 119$ Gly heeft geen invloed op de functie van het molecuul, ondanks zijn betrokkenheid in moleculaire contacten tussen de α_1 - en β_1 -ketens.

Het gebruik van IEF, cation exchange HPLC en reversed-phase-HPLC bij het zoeken naar Hb abnormaliteiten leidde tot de ontdekking van een nieuwe β -keten variant, namelijk Hb-Zengcheng. De identificatie van deze variant wordt beschreven in Hoofdstuk 4b. Hb-Zengcheng [$\alpha_2\beta_2 114$ (G16)Leu→Met] werd waargenomen in een chinese pasgeborene. Het leucine residu op positie $\beta 114$ ligt binnenin het molecuul en is niet betrokken bij enig belangrijk contact met het haem of de globine ketens; daarom wordt niet verwacht dat door de Leu→Met uitwisseling de fysicochemische of functionele eigenschappen van de variant zijn veranderd.

In Hoofdstuk 5 wordt de ontdekking van twee onstabiele β -keten varianten beschreven. Zij werden ontdekt door zowel eiwit- als DNA-analyse. Hb-Yokohama of $\alpha_2\beta_2 31$ (B13)Leu→Pro werd waargenomen in een jongetje uit het voormalige Joegoslavië, dat leed aan ernstige transfusieafhankelijke hemolytische anemie. Hoe deze variant werd aangetoond door reversed-phase-HPLC wordt in Hoofdstuk 5a gepresenteerd. Zijn karakterisering werd uitgevoerd door HPLC analyse van materiaal dat verkregen werd door hoog zout precipitatie en door directe bepaling van de volgorde van vermeerderd DNA. De detectie van Hb-Volga of $\alpha_2\beta_2 27$ (B9)Ala→Asp in een 5-jaar oude jongen uit Bosnië-Herzegovina, die aan ernstige hemolytische anemie leed, wordt in Hoofdstuk 5b gepresenteerd. Deze variant werd waargenomen door middel van reversed-phase-HPLC en structureel gekarakteriseerd door HPLC analyse. Een eerdere poging om de Hb-Volga mutatie vast te stellen, door Ava II digestie van vermeerderd DNA, is ook beschreven. De patiënten met Hb-Yokohama en Hb-Volga werden geboren uit gezonde ouders zonder Hb abnormaliteiten. In studies bij de voorouders is een evaluatie van de polymorfismen van de HLA DQa locus betrokken, die bevestigde dat een de novo mutatie in beide ouders was opgetreden.

In Hoofdstuk 6 wordt beschreven hoe drie nieuwe γ -keten varianten worden aangetoond en hoe zij gekarakteriseerd zijn met HPLC. Door middel van preparatieve reversed-phase-HPLC was het mogelijk de abnormale γ -keten in zuivere vorm te isoleren, waardoor zijn karakterisering zeer werd vergemakkelijkt. Tijdens een algemene studie van navelstreng bloed monsters van gezonde Chinese pasgeborenen werd een nieuwe A γ -variant aangetoond. De structurele karakterisering van deze abnormale variant, genaamd Hb-F-Jiangsu, wordt in Hoofdstuk 6a gepresenteerd. Met een structurele analyse van de geïsoleerde A γ^X -keten werd een Val→Met substitutie op positie A $\gamma 134$ aangetoond, waardoor een tamelijk unieke Met-Met volgorde werd gecreëerd. De lokatie van het tweede methionine residu in het γT -15 peptide beïnvloedt de chromatografische eigenschappen van de A γ -keten aanzienlijk. De identificatie van Hb-F-Catalonië of $\alpha_2\gamma_2 15$ (A12)Trp→Arg wordt in Hoofdstuk 6b gepresenteerd. De variant werd waargenomen in

twee Spaanse baby's. Met verschillende HPLC procedures was het mogelijk de Trp→Arg substitutie te identificeren in slechts een geringe hoeveelheid van de G γ X-keten. Hoofdstuk 6c beschrijft de structurele karakterisering van Hb-F-Brooklyn. De variant werd gevonden in een 2-maanden-oud blank meisje tijdens een routine onderzoek van bloed monsters van pasgeboren baby's. De variant kon worden aangetoond met IEF, cation exchange HPLC en reversed-phase-HPLC. Door structurele analyse kon een Lys→Glu substitutie op positie G γ 66 worden aangetoond. Het is nog niet bekend of de substitutie, die wordt waargenomen in drie nieuwe γ -keten anomalieën, enig effect heeft op de functionele of fysicochemische eigenschappen van deze varianten; zulke studies waren niet mogelijk door gebrek aan materiaal.

Hoofdstuk 7 behandelt de identificatie van het onstabiele Hb-Montréal met een deletie van drie aminozuren (Asp, Gly, Leu) op posities 73, 74 en 75 van de β -keten en een insertie van vier verschillende residuen (Ala, Arg, Cys, Glu) op dezelfde lokatie. De variant werd waargenomen in een 7-jaar-oude jongen die leed aan een milde hemolytische anemie. De ouders van de jongen, zijn zuster en zijn broer waren normaal. De introductie van een extra aminozuur residu en de veranderingen in de holte waar de haemzak ligt, zijn de waarschijnlijke oorzaak van de instabiliteit van dit abnormale Hb. De bovengenoemde veranderingen werden gedetecteerd door de tryptische peptiden van de β -Montréal keten te analyseren door de volgorde van vermeerderd DNA direct te meten of door hybridisatie van dit DNA met specifieke oligonucleotide probes. Analyse van de DNA volgorde maakt het mogelijk te voorspellen wat het (de) waarschijnlijke mechanisme(n) is (zijn) voor het optreden van deze ongewone variant. Het wordt gesuggereerd dat foutieve base paring, waarbij de repeterende AGTG volgorde bij CD's 66 en 67 en bij CD's 72 en 73 van het normale β -gen een rol speelt, een duplicaat van het 16 bp segment veroorzaakt, terwijl een deletie van 10 nts dankzij recombinitie of glijden, gevolgd door een korte (3 bp) deletie tijdens DNA reparatie, de abnormaliteit van het Hb-Montréal zou kunnen hebben veroorzaakt.

De aanzienlijke vooruitgang die werd gemaakt bij de studie van Hb-varianten was primair mogelijk door de ontwikkeling van gevoeliger en snellere methoden bij hun detectie en karakterisering. Enkele van de belangrijkste methodologische prestaties in de studie van Hb-varianten worden kort besproken in Hoofdstuk 8. In het verleden zijn verschillende elektroforetische en chromatografische technieken ontwikkeld; deze hebben een belangrijke rol gespeeld bij de detectie en karakterisering van talrijke Hb-varianten. Wegens hun veranderde elektroforetische eigenschappen zijn de meeste gewone Hb-varianten al reeds 20 tot 30 jaar geleden ontdekt. De Hb-varianten, die de laatste jaren zijn ontdekt, zijn zeldzame abnormaliteiten, die vaak een mutatie hebben die moeilijk op te sporen is met elektroforetische procedures, of een tamelijk ingewikkelde structuur hebben. Vergevoerde methodologie zoals HPLC-procedures en DNA-analyses zijn vereist voor hun karakterisering.

Momenteel zijn IEF, cation exchange HPLC en reversed-phase-HPLC de methoden, die als eerste gekozen worden, voor de detectie en de bepaling van het voorkomen van Hb-varianten. Reversed-phase-HPLC voor peptide analyse is een zeer bruikbare techniek voor structurele karakterisering van abnormale Hb's op het eiwit niveau, maar zal worden vervangen door het bepalen van de volgorde van vermeerderd DNA van de α -, β -, δ - of γ -genen. De identificatie van Hb's met complexere structuren en met specifieke fysicochemische eigenschappen zal volledig afhankelijk zijn van de toepassing van DNA-methodologie.