

DNA-Chips

moderne Diagnosewerkzeuge der molekularen Ökologie



Aus Bodenprobe
isolierte
Pilzhyphen.

An den Stoffkreisläufen im Boden ist eine Vielzahl unterschiedlicher mikrobieller Organismen beteiligt. Den zahlen- und massenmäßig bedeutendsten Anteil stellen Bakterien und Pilze. Trotzdem fehlen genauere Vorstellungen über Funktion und Populationsdynamik der meisten pilzlichen und bakteriellen Bodenorganismen.

Ein wichtiger Grund dafür ist, dass bodenbewohnende Organismen zum Teil nicht oder nur mit großem Aufwand im Labor zu kultivieren sind. Dies gilt besonders für Mikroorganismen, die Lebensgemein-

schaften mit anderen Organismen bilden. Ein Beispiel sind die als Wurzel-Mykorrhizen mit Waldbäumen vergesellschafteten Basidiumpilze, zu denen die meisten bekannten Waldpilze gehören. Ein weiteres Beispiel sind die so genannten Kommensalen oder Endosymbionten, die im Darmtrakt von Springschwänzen, Kurzflüglern und anderen Bodentieren vorkommen oder in speziellen Organbildungen (Myzetomen) von Bodentieren leben. Morphologisch-anatomische Merkmale und das Stoffwechsellpotential dieser Mikroorganismen sind kaum bekannt.

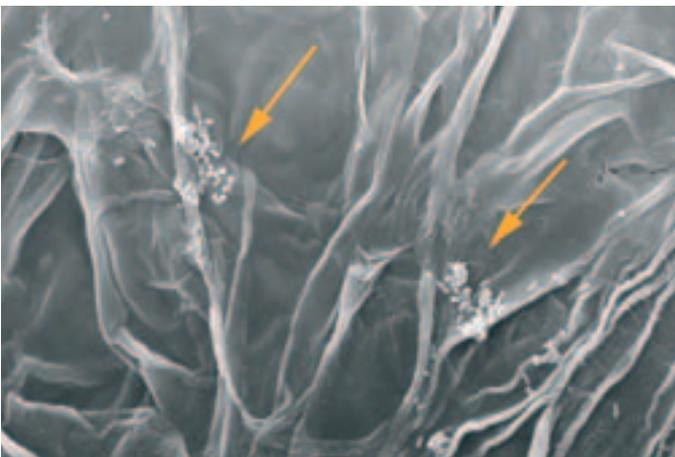
Bis vor kurzem musste sich die Bodenbiologie beim Studium der diversen Stoffkreisläufe in der Regel mit Bilanzmessungen begnügen. Die einzelnen Prozesse und physiologischen Aktivitäten der beteiligten Mikroorganismen sowie ihre exakte Lokalisierung im Boden waren meist nicht eindeutig darstellbar. Weiterhin konnten *in situ* beobachtete enzymatische Prozesse nicht den einzelnen Organismen zugeordnet werden. Dies galt selbst für Schlüsselprozesse wie zum Beispiel die Nitrifikation im Stickstoffkreislauf.

Erste molekularbiologische Ansätze erlaubten zwar mit DNA bzw. RNA aus Boden-Extrakten vorhandene Organismen bzw. aktive Gene nachzuweisen. Durch *in situ*-Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden konnten sie im Boden genau lokalisiert werden. Allerdings wurde die Analyse großer Datenmengen durch hohe Materialkosten und den immensen Zeitaufwand dieser Technik begrenzt.

Die Schwierigkeiten sind dank der Entwicklung von Microarrays (oder „DNA-Chips“) jetzt überwunden (siehe Kasten). Mit spezifischen Sonden können pro Chip viele tausend Zielorganismen und enzymkodierende Gene gleichzeitig nachgewiesen werden. Bei adäquater Analysendichte können so im Boden stattfindende Prozesse z. B. des Kohlenstoff- oder Stickstoffkreislaufs auf verschiedenen Ebenen charakterisiert, quantifiziert und integriert werden.

Ein solches Verfahren ist besonders hilfreich, um z. B. Störungen durch anthropogene Einflüsse rechtzeitig zu erkennen (globale Eutrophierung, Emission klimarelevanter NO_x-Gase, Änderungen des Stickstoff-Phosphor- bzw. des Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnisses in Böden). Ziel laufender Projekte ist deshalb das Design von Microarrays, mit denen sich sowohl die mikrobielle Diversität im Boden als auch das Expressionsmuster bakterieller und pilzlicher Schlüsselenzyme identifizieren lässt. Weiterhin sollen Microarrays dazu eingesetzt werden, Änderungen der Genexpression in Abhängigkeit von Umweltfaktoren und Stress zu analysieren. Die verschiedenen methodischen Ansätze erlauben es, das genetische und enzymatische Potential mit der tatsächlich stattfindenden Genexpressions-Aktivität zu korrelieren.

Die in Böden vorkommenden Bakterien und Pilze werden mit Taxon- bzw. Enzym-spezifischen Oligonukleotid-Sonden erfasst. Als „Taxa“ sind hierbei genetisch mehr oder weniger einheitliche Linien auf



Rasterelektronische
Aufnahme von
Bakterien auf
Innenseite des Vor-
darms einer
Insektenlarve.

den verschiedensten Verwandtschaftsebenen zu verstehen: Dabei werden im Allgemeinen artspezifische DNA-Sonden mit Gruppenspezifischen Sonden (auf der Ebene von Gattungen, Familien, Ordnungen und sogar Klassen) kombiniert. Die für höhere phylogenetische Ebenen spezifischen Sonden

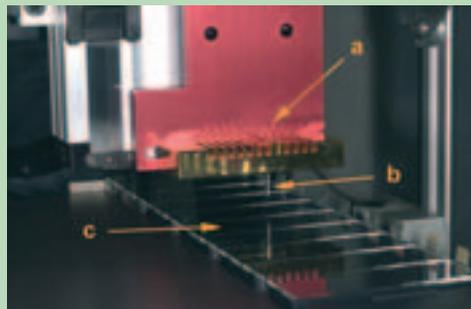
erlauben über eine verwandtschaftliche Zuordnung hinaus auch den Nachweis noch unbekannter Taxa der jeweiligen Gruppe. Die Taxonspezifischen Sonden dienen ausschließlich dem Nachweis der vorhandenen (auch toten) Organismen, die Genspezifischen Sonden dem der aktiven Enzyme.

Von hohem bioindikativen Wert ist zum Beispiel der Nachweis der Transkripte („Messenger-RNA“) von Schlüsselenzymen der Stickstofffixierung (bakterielle Nitrogenasen) oder des Holzabbaus (pilzliche Laccasen oder Lignin-Peroxidasen). Kongruenzen von Signalen der Genexpression und phylogenetischen Markern erlauben Korrelationen der Enzymproduktion mit bakteriellen und pilzlichen Verwandtschaftslinien. So kann die Bedeutung einzelner mikrobieller Organismengruppen für den Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus sowie weitere Stoffwechselprozesse im Boden nachgewiesen werden. Unterschiede in den Sequenzen enzymkodierender Gene bei verschiedenen Verwandtschaftsgruppen ermöglichen es theoretisch auch Taxon- und gleichzeitig Gen-spezifische Oligonukleotid-Sonden zu konstruieren. Fazit: Mit der DNA-Chip-Technik hat die Ökologie ein zukunftsträchtiges Diagnosewerkzeug zur Hand. Mit ihr können Zusammensetzung, Architektur und Aktivitäten mikrobieller Lebensgemeinschaften dargestellt werden. Diese Daten sind Voraussetzung, um den aktuellen Zustand von Böden charakterisieren und zukünftige Entwicklungen einschätzen zu können. ■

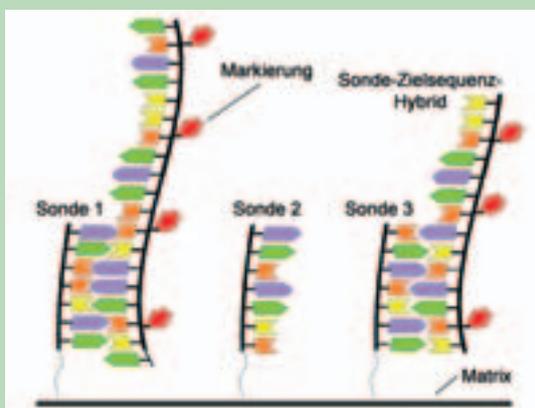
Flussdiagramm zur Etablierung und Verwendung von DNA-Chips zur molekularbiologischen Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften.

DNA-Chips

DNA-Chips, auch Bio-Chips oder DNA-Microarrays genannt, können zur Identifikation von Mikroorganismen, zur Mutationsanalyse einzelner Gene und zu komplexen Genexpressionsanalysen eingesetzt werden. DNA-Chips bestehen aus einem planaren Trägermaterial, der Matrix, auf der einzelsträngige DNA-Fragmente bekannter Sequenz, die sogenannten Sonden, systematisch angeordnet sind. Mit Hilfe von Robotern werden hunderte bis tausende Sonden auf einer Glas-Matrix von wenigen Quadratzentimetern an definierten Stellen immobilisiert. Während eines Chip-Experimentes wird zunächst das zu analysierende Nukleinsäuregemisch mit



DNA-Arrayer Omnigrad 100: Print Head (a) mit Nadel (b) zum Drucken von Microarrays auf die Glasträger (c). Der Übersichtlichkeit wegen ist hier nur eine Nadel eingebaut.

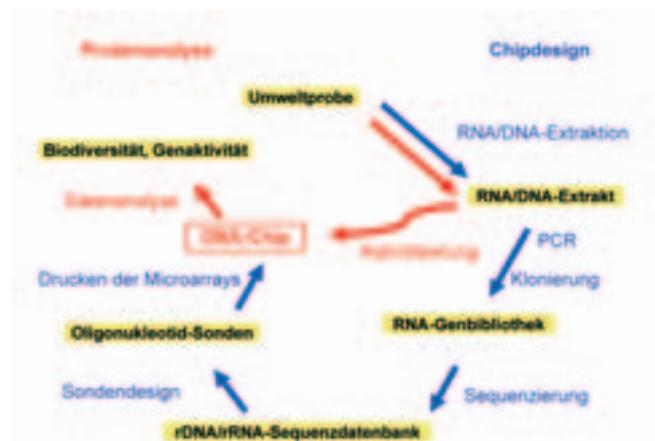


Schematische Darstellung der Hybridisierung auf einem DNA-Chip.

Fluoreszenzfarbstoffen markiert und dann unter geeigneten Bedingungen mit den auf dem Chip immobilisierten Sonden hybridisiert. Dabei binden die markierten Nukleinsäurefragmente mit ihren komplementären Bereichen an die Sonden. Sonde-Zielsequenz-Hybride werden über den Fluoreszenzfarbstoff detektiert.

Ein entscheidender Vorteil der DNA-Chip-Technik gegenüber klassischen molekularbiologischen Verfahren ist, dass gleichzeitig eine Vielzahl unterschiedlicher Gene bzw. Zielsequenzen in einem Nukleinsäuregemisch analysiert werden können.

Ausschnitt aus einem DNA-Microarray mit fluoreszenzmarkierter, an spezifischen Oligonukleotid-Sonden gebundener DNA.



*Prof. Dr. Gerhard Rambold
Abteilung Mykologie und Lichenologie
www.bayceer.uni-bayreuth.de/Rambold*