

## Statusbericht DNA-Chip 10.10.2005

Der rasante Anstieg einschlägiger Publikationen in der rezenten Literatur unterstreicht eindrücklich das grosse Potential von Microarrays in der molekularen Diagnostik. Durch den hohen Grad an Redundanz, den solche diagnostischen Chips ermöglichen, sind sehr robuste Diagnosen auf allen gewünschten taxonomischen Ebenen möglich.

Wir haben eine kostengünstige und effiziente Methode für die Entwicklung und den Einsatz von diagnostischen Oligonukleotid-Microarrays entwickelt, die sich bei so unterschiedlichen Organismengruppen wie Viren, Bakterien und Säugetieren bewährt hat. Dieselbe Methode wurde in unserem Labor kürzlich erfolgreich für cDNA-Microarrays zur Analyse von regulatorischen Prozessen bei Mikroorganismen eingesetzt.

Wir verfolgen zwei unterschiedliche Strategien, um bekannte und unbekannte Genome zu charakterisieren:

1) Entwicklung so genannter Gen-Chips. Dazu werden Fragmente von einem oder mehreren Genen amplifiziert, die auf einer gewünschten taxonomischen Ebene wenig bis keine Unterschiede innerhalb von Gruppen, aber deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen aufweisen. Diese diagnostischen Proben adressieren unterschiedliche taxonomische Ebenen. Mit dieser Strategie lassen sich also sowohl bekannte Organismen, für welche Proben auf dem Chip sind, auf der gewünschten taxonomischen Ebene, z.B. der Art, eindeutig identifizieren. Es lassen sich aber auch unbekannte Organismen in die entsprechenden höheren taxonomischen Gruppen einordnen. Gibt es von einer Art keine Proben auf einem Chip, kann trotzdem festgestellt werden, zu welcher Gattung diese Art gehört. Diese Strategie ist ausgereift und hat zu mehreren Publikationen geführt.

Neue diagnostische Microarray-Chips können in unserm Labor mit einem berechenbaren Aufwand entwickelt werden. Zur Zeit arbeiten wir an einem Set von Chips, die alle Europäischen Quarantäneorganismen auf dem Artniveau identifizieren können. Einen der Chips entwickeln wir für alle Bakterien und Phytoplasmen, die auf der Liste der Quarantäneorganismen der EPPO (European Plant Protection Organisation) aufgeführt sind. Dieses Projekt wird als Teilprojekt der COST Aktion 853 „Agricultural Biomarkers for Array Technology“ unterstützt. Fast alle der aufgeführten Bakterien konnten bereits beschafft werden. Für ihre Identifikation evaluieren wir neben einem DNA-Fragment der 16S rDNA Fragmente von vier weiteren Genen (citrate synthase *gltA*, DNA-directed RNA polymerase [beta subunit *rpoB*], cell division protein *ftsZ*, heat shock protein *groEL*).

Ein zweiter Chip wird Proben für Quarantäne-Insekten enthalten. Die Beschaffung von DNA oder Gewebeproben von Insekten hat sich als sehr schwierig erwiesen. Wir konzentrieren uns daher gegenwärtig auf die Familie der Tephritiden. Bisher konnten wir neun Arten aus zwei Genera (*Bactrocera* und *Rhagoletis*) analysieren, wovon fünf auf der EPPO Liste aufgeführt sind. Für die Identifikation von Insekten verwenden wir zwei mitochondrial Gene (Cytochrom Oxidase I, Cytochrom b).

2) Die zweite Strategie befindet sich noch im Entwicklungsstadium. Das Ziel dieser Strategie ist die Etablierung von beliebig vielen anonymen Markern (DNA-Fragmenten), die vom gesamten Genom stammen. Im Gegensatz zur ersten Strategie, bei der die Zielsequenzen auf dem zu untersuchenden Genom genau bekannt sind und die Proben entsprechend spezifisch angelegt werden, wird hier vom Organismus ein genetischer „Fingerabdruck“ erstellt. Die eigentliche Diagnose erfolgt mittels einer Mustererkennung über einen Vergleich mit den entsprechenden Daten von Typenproben. Diese zweite Strategie hat grosse Vorteile, indem keinerlei Kenntnisse der DNA der Zielorganismen notwendig sind, und indem die genetischen Informationen vom gesamten Genom stammen und nicht nur von einem einzelnen oder wenigen Genen.

Wir haben mit verschiedenen Methoden versucht, die Empfindlichkeit der Detektion und das Markieren der Proben so zu optimieren, dass zuverlässige Daten erhoben werden können. Unsere Versuche aus diesem Sommer zeigen jedoch, dass dazu ein Amplifikationsschritt unumgänglich ist. Dabei soll die Markierung, das heisst, die Abfrage über die Präsenz/Absenz einer bestimmten Probe, immer noch direkt auf dem Genom stattfinden und nicht wie sonst üblich auf zuvor selektiv amplifizierten Fragmenten. Wir haben daher zwei neue Methoden entworfen, die den Vorteil des direkten Markierens mit einer Signalamplifikation verbinden, ähnlich wie bei der bewährten Technik der „Padlock-Probes“. Zur Zeit laufen Versuche mit diesen Methoden.