

Reporting 2006

Das Ziel des Projektes ist die Entwicklung einer robusten und ökonomischen Methode zur raschen Identifikation und genetischen Charakterisierung pathogener Mikroorganismen durch diagnostische Microarrays. Um dieses Ziel zu erreichen werden zwei Strategien verfolgt: 1) Gen-Microarrays mit hierarchisch aufgebauten, Taxon-spezifischen Sonden, und 2) Genom-Microarrays, die auf hochdichten, kurzen Genom-Sonden mit zufallsmässiger DNA-Sequenz basieren.

Die hierarchischen Gen-Microarrays enthalten Sonden, die an bekannte DNA-Sequenzen hybridisieren (zB 16S rDNA, rpoB) und die unterschiedliche taxonomische Ebenen ansprechen (zB Familie, Gattung, Spezies, Subspezies). Die entsprechenden Sonden für 16S rDNA wurden unter Einsatz der ARB-Datenbank designed. Die für das Design von Sonden für andere Gene (housekeeping genes, zB rpoB) notwendigen Sequenzierungen sind in Arbeit. Die Spotting- und Hybridisierungsparameter für die Sonden von 12 phytopathogenen Mikroorganismen wurden optimiert.

Im Modellversuch besteht ein Genom-Microarray aus ca. 95'000 Sonden. Diese Sonden sind zufällige DNA-Sequenzen, deren Länge so gewählt ist, dass im Durchschnitt eine Sonde nur einmal mit dem zu hybridisierenden bakteriellen Genom hybridisieren wird. So führt die Hybridisierung mit der DNA eines bestimmten Mikroorganismus zu einem für dieses Taxon spezifischen Muster. Computersimulationen haben bereits früher gezeigt, dass diese Strategie sehr robuste Identifikationen ermöglicht. Die erfolgreiche Umsetzung dieser Strategie erfolgte im Labor durch einen 364 Sonden Array der mit verschiedenen bakteriellen Proben hybridisiert wurde. Für das Design der ca. 95'000 Sonden des Genom-Microarrays mussten neue Programme entwickelt werden. Zwei Sets mit 95281 bzw. 94460 Sonden, die bestimmte Voraussetzungen erfüllen (zB keine „hairpins“, kein poly-N>6bp, keine inversen Sequenzen) wurden bereits designed.

Planung 2007

Gen-Microarray: Die Hybridisierung des bestehenden Gen-Microarrays mit verschiedenen Mikroorganismen werden zeigen, ob die Sonden die gewünschte Auflösung erlauben, ob also eine Identifikation des Mikroorganismus auf dem gewünschten taxonomischen Niveau möglich ist. Die Sequenzierung von weiteren „housekeeping genes“ wird fortgesetzt, um eine Unterscheidung von sehr nahe verwandten Mikroorganismen zu ermöglichen. Eine statistische Analyse ist geplant, die zeigen soll, wie sich der Effekt der Redundanz (zusätzliche Sonden pro Taxon) auf die Robustheit der Diagnose auswirkt.

Genom-Microarray: Hybridisierungen mit Mikroorganismen unterschiedlicher taxonomischer Verwandtschaftsbeziehungen (Differenzierung von Klassen bis Pathovar) sollen zeigen, wie gut das taxonomische Differenzierungsvermögen des Genom-Microarrays ist. Mischungen von Mikroorganismen werden ebenfalls hybridisiert, um zu untersuchen, ob und mit welchen statistischen Methoden eine korrekte Identifikation von Mischkulturen (und bis zu welchem Grad) erreicht werden kann. Die Auswertungen werden ebenfalls zeigen, wie viele Proben für eine robuste Identifikation notwendig sind.