

Det myldrer med svampe-DNA i sibirisk permafrost

På Novozymes er store ressourcer allokeret til at udvikle metoder til at lede efter enzymer i alle tænkelige økologiske nicher. Disse nicher inkluderer nu også forhistorisk DNA fra Sibirien, der i løbet af de seneste to år er blevet screenet for svampe-DNA

Af Jonas Jacobsen, Magnus Lydolph og Lene Lange, *Microbial Discovery*, Novozymes A/S

Jurassic Park er på ingen måde lige om hjørnet, men alligevel giver forhistorisk DNA en unik mulighed for at studere evolution, migration og ændringer i populationssammensætninger gennem tid. Herigennem øges videnskabens muligheder for at belyse konkrete problemstillinger som eksempelvis slægtskabet mellem menneske og neandertaler, menneskets udvandring fra Afrika og sidst men ikke mindst klimatiske fluktuationers indvirkning på økosystemet. Siden opfindelsen af den sensitive polymerase chain reaction (PCR), der benyttes til at mangfoldiggøre på forhånd udvalgte DNA-fragmenter, har adskillige af sådanne undersøgelser set dagens lys. Senest er PCR blevet

anvendt til at beskrive hele plante- og dyreøkosystemer fra en svunden tid ud fra mindre end 2 g jord.

I det pågældende studium blev DNA fra fire sibiriske permafrostboringer af forskellig alder isoleret og undersøgt for tilstedeværelsen af svampe-DNA. Formålet var at kortlægge svampediversiteten vha. ribosomal-gener samt at undersøge muligheden for at benytte forhistoriske prøver til at lede efter enzymkodende gener. Den helt basale forskel mellem de to målsætninger ligger i at ribosomal-generne findes i mange hundrede kopier pr. celle, mens mange af de enzymkodende gener kun findes i få eller et enkelt kopi i genomet. Et forhold



Effektiv

- Eksplosive gasser
- Sundhedsskadelige dampe
- O₂ og CO₂
- Kulilte
- Arbejdsmiljø omkring koleanlæg

detektering

af gasser og dampe





Væg-alarm-centraler.

Detektorer

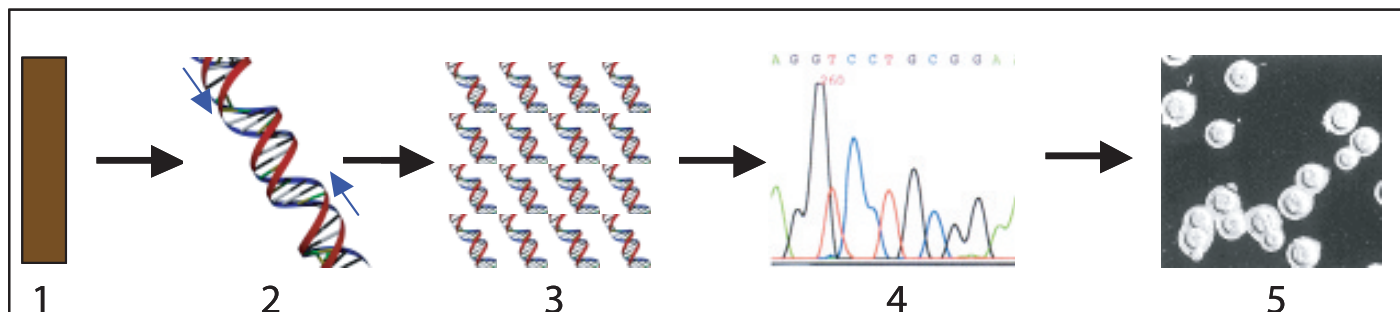
Rack-systemer

geopal SYSTEM A/S

Skelstedet 10B - DK-2950 Vedbæk
Telf. 45 67 06 00 - Fax 45 66 12 05
Hjemmeside: www.geopal.dk - E-mail: info@geopal.dk







Figur 1. Dyrkningsuafhængig screening af permafrostjord.

1) Permafrostkerne med lave koncentrationer af fragmenteret DNA.

2) DNA-streng isoleret direkte fra blandet jordprøve. De blå pile illustrerer de såkaldte PCR-primere, der fungerer som DNA-fiskestænger under PCR-reaktionen.

3) DNA-sekvensen mellem primerne er blevet mangfoldiggjort vha. PCR.

4) Det mangfoldiggjorte DNA bliver sekvenseret, og for hver en klon findes nu en unik basesekvens.

5) Hver klons basesekvens sammenlignes med nulevende svampes basesekvenser for at kunne bestemme det nærmere slægtskab, i dette tilfælde *Cryptococcus* sp.

der mht. PCR spiller en meget væsentlig rolle, når det DNA, man undersøger, er kraftigt fragmenteret.

Dyrkningsuafhængig PCR

Traditionel PCR tager udgangspunkt i DNA isoleret fra rene kulturer af eksempelvis svampe eller bakterier. Denne teknologi er meget effektiv, men lider under at størstedelen af jordens mikroorganismer, formentlig 99%, ikke kan bringes til spiring i et laboratorium. For at få den maksimale information ud af permafrost-DNA'et benyttede vi os af en ny variant af PCR kaldet dyrkningsuafhængig PCR (figur 1). Som navnet antyder, er denne teknik ikke begrænset af evnen til at dyrke en given mikroorganisme op i en petriskål, og man får derfor den totale pool af DNA i den blandede jordprøve til rådighed. Den store udfordring ligger så i, via sekvenssammenligninger med nulevende svampe, at finde ud af, hvilke svampe ens DNA-sekvenser stammer fra.

DNA-nedbrydning og kontaminering

I levende organismer bliver beskadiget DNA løbende repareret af et komplekst netværk af enzymer, der i hovedreglen er garant for, at cellen viderefører det samme arvemateriale, som var det oprindelige udgangspunkt. I døde eller metabolsk inaktive celler er der derimod intet, der kan hindre en kontinuerlig nedbrydning af DNA'et. Denne nedbrydning forestås til at starte med af nucleaser og siden hen via hydrolytisk og oxidativ nedbrydning. Skadestyper der resulterer i alt fra brud på DNA-strengen til substitutioner af de enkelte baser. Et faktum der er med til at besværliggøre studier af forhistorisk DNA, især fordi der er meget lidt DNA til stede i længder, det giver mening at mangfoldiggøre med PCR. Som følge af de meget lave DNA-koncentrationer i forhistoriske prøver er arbejde med gammelt DNA meget udsat for kontaminering med moderne DNA. Man formoder desværre, at den ekstremt store risiko for kontaminering kan forklare og afkræfte de mest opsigtsvækkende fund af eksempelvis 100 mio. år gammelt dinosaur-DNA fra ravindkapslede insekter. For at undgå publicering af lignende falske positive resultater er studier på gammelt DNA i dag underlagt en række omstændelige kriterier omhandlende de eksperimentelle procedurer. Særligt vigtigt er det, at alt PCR-arbejde udføres i et UV-udstyret laboratorium (figur 2, side 34), der ikke tidligere har været anvendt til PCR-arbejde på moderne DNA. Desuden er eftergørelse af resultater i et uafhængigt laboratorium en uomtvistelig nødvendighed.

Masser af ribosomalt-DNA

I alle tre forhistoriske jordprøver, dateret hhv. 10.000 år, 20.000 år og 300-400.000 år gammelt, var det muligt at detektere

svamperelateret ribosomalt-DNA samt ribosomalt DNA fra en lang række af andre organismer heriblandt planter, pattedyr, alger og insekter. Som noget helt særligt lykkedes det at finde bevarede DNA-sekvenser på op til 510 basepar fra en overraskende stor diversitet af svampe. Fund af 510 basepar lange DNA-fragmenter fra Pleistocene-tiden (300-400.000 år) udgør det længste eukaryot-DNA, der hidtil er fundet. Indtil nu har der hersket en udbredt opfattelse af, at såfremt man kunne finde DNA længere end få hundrede basepar fra prøver ældre end 10.000 år, så måtte det stamme fra særligt adapterede *anabiotiske* mikroorganismer. Mikroorganismer med en enestående evne til at lukke ned for metabolismen for senere at

Invitation
Scanlab/Biotech Forum



**SådanSådan...
...ser vor stand ud**

Inden vi sætter produkter op fra:

Applikon, AppliSens, addVise, Dr. Weigert, Fedegari, Firlabo, Flow Control, Gram, Hirayama, Lab-Line, Lancer, Hach Ultra Analytics, Revco.

Igen i år byder vi på en kølende Soft Ice!

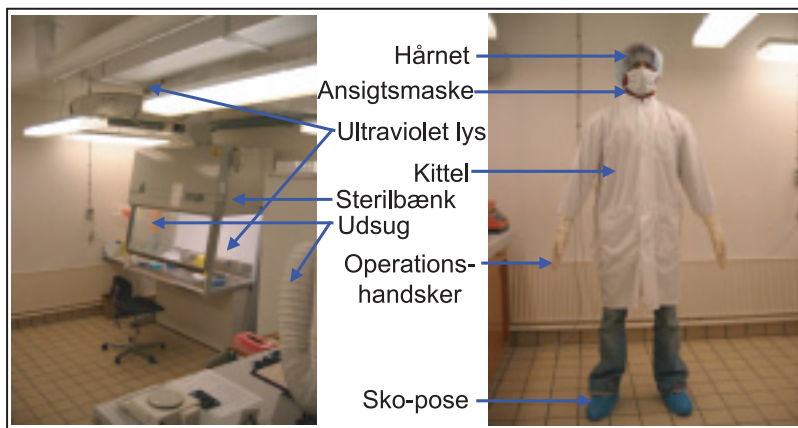
Med os på Scanlab/Biotech Forum 2004 i Bella Center. Vi er på stand nr. C3-015+016 fra 2. til 5. oktober.

Gratis adgang for besøgende i år.

Spørg os eller find links til pre-registrering på www.scanlab.dk



Bakkedirtvej 282
DK-3650 Humsbæk
www.clausdamms.dk
mail@clausdamms.dk
Tel. 4916 3388
Fax. 4916 3330



Figur 2. Laboratorium dedikeret til arbejde med gammelt DNA. I laboratoriet, der ligger i kælderen under Biologisk Institut, er der taget en række foranstaltninger for at mindske risikoen for forurening med moderne DNA. Helt essentielt er tilstedeværelsen af ultraviolet lys i både loft og sterilbænk. Desuden udføres alt arbejde i laboratoriet af særligt trænet personel iført håernet, ansigtsmaske, kittel, operationshandsker og skoposer.

blive genoplivet fra dette dvalelignende stadie. Den ekstremt store diversitet af svampe-DNA, vi fandt, peger derimod i retning af, at DNA-fragmenter af den længde rent faktisk kan overleve ubeskyttet, såfremt forholdene er de rette. Netop forholdene må betegnes som noget nær perfekte i den sibiriske permafrost med en konstant temperatur på -12°C , et anaerobt miljø og tæt på neutral pH.

Imponerende diversitet i 300-400.000 år gammel permafrost

Det er almindeligt kendt, at dyrkningsuafhængige screeninger af moderne jord ofte afslører endog meget stor diversitet af svampesekvenser. Det vil ofte være sådan, at redundansen (= genfinding) i data, selv efter sekvensering af flere hundrede kloner, er forsvindende lille. Det er dog ofte blevet vist at forholde sig omvendt i forhistoriske jord og iskerner, hvor der findes en lineært aftagende sammenhæng imellem alder og sekvensdiversitet. Derfor var det mindst talt forbavsende, at diversitetskurver lavet over den ældste permafrostprøve på 300-400.000 år ikke viste tegn på mætning efter sekvensering af 60 kloner (figur 3).

Fortidens livsformer

De amplificerede DNA-sekvenser blev via forskellige bioinformatiske værktøjer identificeret til klasse- og ordensniveau under de tre store svamperækker Ascomycetes, Basidiomycetes og Zygomycetes. Et stort antal sekvenser viste lighed med gær-svampe af *Cryptococcus*-slægten (Basidiomycetes). Svampesporer af denne type er kendetegnet ved at være kapsulerede og dermed i stand til at overleve tø-frysecykler. Man kan nemt forestille sig, at en sådan tilpasning har fremmet overlevelsen af *Cryptococcus*-populationer fra år til år i det ekstreme arktiske klima.

Identifikation af DNA-sekvenserne indikerer, at en stor del af svampene har levet som parasitter på planter i forhistorisk Sibirien. Især rustsvampe fra Uredinomycetes-klassen (Basidiomycetes) og svampe med frugtlegemer fra Leotiomycetes-klassen (Ascomycetes) var dominerende blandt hittene, og det er tænkeligt, at den sparsomme vegetation af græsser og buske, ud over de barske temperaturer, har måttet lægge krop til omfattende svampeangreb.

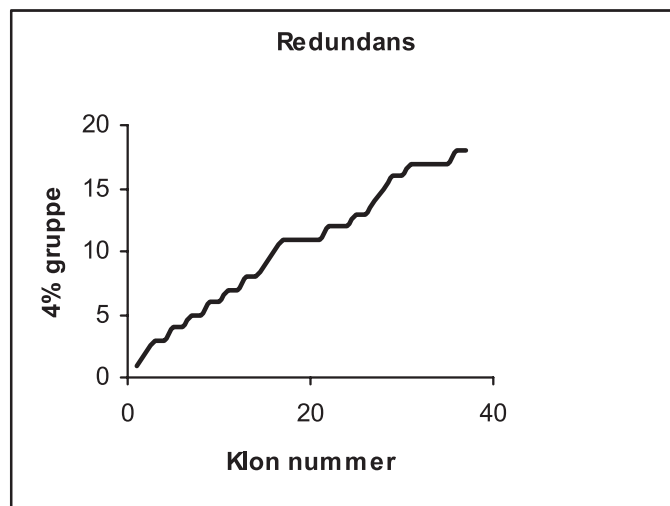
Fund af en række sekvenser med lighed med nulevende arktiske sortpigmenterede svampe indikerede, at melanin har spillet og stadig spiller en vigtig rolle i mange kuldetilpassede svampe. Det skyldes formentlig, at det sorte pigment melanin, ud over at beskytte DNA'et fra skadelige UV-stråler, er i stand til at transformere den indkomne stråling til varme.

Sidst men ikke mindst var det muligt at identificere DNA-sekvenser med høj lighed med svampe og alger involveret i lavsymbiose. Implikationerne af dette kan vise sig at være store, idet laver i stigende grad benyttes som miljøindikatorer. Derfor er det muligt, at man i fremtidige studier kan kortlægge sammensætningen af laver i de samme prøver mhp. at sammenholde dem med abiotiske data om klima og miljø.

Ifølge de rapporterede hits fra GenBank BLAST's søgefunktion indeholdt de sekvenserede kloner ikke DNA fra saprophytter, der lever af at nedbryde plantemateriale, så som *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* og *Penicillium*. Det var uventet, og selv om at man bør holde sig fra at diskutere negative PCR-resultater, så er det en oplagt mulighed, at fraværet kan forklares med, at disse svampetyper sporer ikke besidder den samme beskyttelse af DNA'et, som kendetegner sporerne fra mange af de livsformer, der dominerede prøverne.

Som krolle på halen

For nylig viste forskerne Eske Willerslev og Anders J. Hansen fra Københavns Universitet, at både den 10.000 år og den 20.000 år gamle prøve overraskende indeholdt DNA-sekvenser fra flere forskellige store pattedyr, herunder mammut, steppebison, hest og moskusokse. Der har siden været diskuteret en del frem og tilbage om, hvorfor få gram tilfældigt udvalgt jord



Figur 3. Redundans af 510 basepar kloner i 300-400.000 år gammel prøve. Figuren viser, hvordan der stort set ikke er nogen genfinding af de samme sekvenser. Selv ikke når der, pga. af DNA-skader og heterogenitet i ribosomal-generne, tillades en sikkerhedsgrænse på 4% forskel blandt identiske sekvenser.

indeholdt DNA fra så relativt mange pattedyr. Vores studie viste, at netop de samme prøver indeholdt DNA fra forskellige koprofile (fæces-elskende) og keratinofile (keratin-elskende) svampe, hvilket har været med til at opbygge en hypotese om, at fækaliier, negle, hud og pels var kilden til det pattedyrsrelaterede DNA.

Hvad med enzymgenerne?

Til trods for mange ihærdige forsøg lykkedes det ikke at isolere enzymkodende cellulase-, amylase- og amyloglucosidasegener fra prøverne. Der findes mange bud på, hvorfor det ikke lykkedes, hvoraf de mest oplagte er enzymgenernes enkeltkopi natur, der nedsætter chancen for at »fiske« template DNA'et i PCR-reaktionen. Det er derfor tænkeligt, at en række tiltag,

såsom DNA-opkoncentrering, valg af andre gener, design af nye primere og optimering af PCR-opstillingen, kunne øge chancen for succes i fremtidige forsøg. Selv hvis det kun skulle lykkes at fiske korte DNA-fragmenter i fremtiden, er der ikke noget teknisk til hinder for, at et sådan fragment via gen-shuffling kunne indsættes i et kendt enzymgen og blive udtrykt. Drømmen om enzymernes Jurassic lever altså stadig.

E-mail-adresse:

Jonas Jacobsen: jacobsenjonas@hotmail.com

Kilder

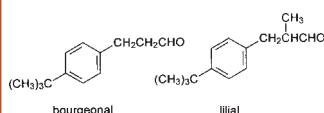
1. Mcinerney, J.O., Mullarkey, M. (2001). Bacteria and archaea: Molecular techniques reveal astonishing diversity. *Biodiversity* 3, 3-10.
2. Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M., Paabo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics* 2, 353-359.

3. Hoss, M., Jaruga, P., Zastawny, T.H., Dizdaroğlu, M., Paabo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* 24, 1304-1307.
4. Soina, V.S., Vorobiova, E.A., Zvyagintsev, D.G., Gilichinsky, D.A. (1994). Preservation of cell structures in permafrost - A model for exobiology. *Life Sciences and Space Research Xxv* (4) 15, 237-242.
5. Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. *Biochemical J.* 280, 309-316.
6. Willerslev, E., Hansen, A.J., Binladen, J., Brand, T.B., Gilbert, M.T.P., Shapiro, B. *et al.* (2003). Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science* 300, 791-795.

Nyt om...

sædceller elsker liljekonvaller

Fisk og andre havdyr spreder ofte en mængde æg og sædceller over et stort område og håber så, de finder hinanden. Det har vist sig, at sædceller har »lugtreceptorer« til hjælp. Hvis man stikker et kapillarrør med *bourgeonal*, 3-(4-*tert*-butylphenyl)-propanal, der er duftstoffet i liljekonvaller, ned til



sædceller fra søpindsvin, svømmer sædcellerne dobbelt så hurtigt mod kapillarrøret. Det samme ses med *lilial*. Denne observation kan have interesse for kunstig befrugtning hos mennesker.

Carl Th.

Sperms get their kicks from lily of the valley, *New Scientist*, 5.april 2003, side16. Smelling the Roses? *Science*, 299, 2003, side 1993. Identification of a Testicular Odorant Receptor Mediating Human Sperm Chemotaxis, *Science*, 299, 2003, side 2054

Det drejer sig om mennesker

LAB LINE® - rene gasser og udstyr til analyseopgaver

Sikkerhed for optimale resultater
LAB LINE® er et sammenhængende totalkoncept, der omfatter rene gasser, gasblandinger (kalibreringsgasser) og udstyr. En ubrudt kvalitetslinie fra vores produktion til dit laboratorium. Vi prioriterer høj kvalitet, sikker sporbarhed og en klar dokumentation.

LAB LINE® omfatter også design og implementering af udstyr, - hele processen fra definering af systemkrav og specifikationer til projektering, installering, indkøring og døgnservice. Vi tilbyder selvfølgelig uddannelse af jeres personale, så I sikres det fulde udbytte af konceptet. Individuel rådgivning kombineret med vores erfaring giver en optimal løsning.

LAB LINE® - centralanlæg omfatter blandt andet:

- Reduktionsventiler
- Udtagsposter
- Rørinstallationer
- Centraler

Tag os med på råd.
Ring til en af vores erfarne specialister og få en snak om LAB LINE® til krævende analyseopgaver.

STRANDMØLLEN INDUSTRIGAS A/S

T 45 80 30 05 • F 45 80 30 17 • www.strandmollen.dk • info@strandmollen.dk