

**Entwicklung eines diagnostischen DNS-Mikroarrays
zur Genotypisierung der Chinolon-Resistenz
von *Escherichia coli***

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Xiaolei Yu

Aus Shanghai, China

Hauptberichter: Prof. Dr. R.D. Schmid
Mitberichter: Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Tag der mündlichen Prüfung: 01. 09. 2004

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart
2004

Zusammenfassung

Chinolone gehören zu den leistungsfähigsten Antibiotika in der Humanmedizin. Die Resistenz gegen Fluorochinolone hat sich wegen des weltweiten Einsatzes dieses Medikaments schnell erhöht. *E. coli* ist eine der am meisten betroffene Spezies. Obwohl *E. coli* von Natur aus gegen Fluorochinolone sensitiv ist, wurde das Auftreten von *E. coli* Stämmen mit verringerter Empfindlichkeit gegen Fluorochinolone häufig beobachtet, besonders im Urinaltrakt-Bereich. Das vermehrte Scheitern von Behandlungen mit Fluorochinolonen ist darauf zurückzuführen. Die therapeutische Verwendung der Chinolone ohne Rücksicht auf eine mögliche Resistenz des Infektionserregers kann zu einem Behandlungsausfall sowie zu einer Induktion neuer Resistenzen führen. Ein schneller und präziser diagnostischer Resistenztest ist daher in der klinischen Anwendung von großer Bedeutung. Bis jetzt benötigen die Standardmethoden zur Detektion von Antibiotika-Resistenzen mehr als einen Tag. Durch die Verwendung der Mikroarray-Technologie kann die Testzeit in Zukunft bis auf wenige Stunden reduziert werden. Darüber hinaus kann die Detektion auf dem molekularen Niveau für die Überwachung von Patienten mit Langzeit-Antibiotikabehandlung und für die Untersuchung der Mechanismen von Resistenzen nützlich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein diagnostischer Mikroarray zur Detektion von Punktmutationen entwickelt. Dieses Mikroarray-System kann die am weitesten verbreiteten Resistenzgenotypen von *E. coli* identifizieren. Anhand der Analyse von Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken sowie eigener Sequenzierungsdaten von klinischen Isolaten, wurden die Aminosäurepositionen 83 und 87 in der Untereinheit A der DNS-Gyrase (Gen *gyrA*) sowie die Aminosäurepositionen 80 und 84 in der Untereinheit A der Topoisomerase IV (Gen *parC*) als Mutationshotspots identifiziert. Die auf diese vier Positionen gerichteten Oligonukleotidsonden wurden so entworfen, dass sie sowohl die wichtigsten resistenzverursachenden Mutationen, als auch die assoziierten stillen Mutationen abdecken. Die Methode der Allel-spezifischen Hybridisierung wurde für den *gyrA*-Array und die Allel-spezifische *primer extension* für den *parC*-Array verwendet. Die Funktionsfähigkeit beider Arrays wurde mit 36 *E. coli* Isolaten aus vier unterschiedlichen Krankenhäusern in Deutschland validiert. Die Ergebnisse der Mikroarray-Analyse stimmten mit den Resultaten der direkten DNS-Sequenzierung und der phänotypischen Untersuchung überein. Um die Assayzeit zu reduzieren und die Sensitivität zu erhöhen, wurden die Markierungs-PCR und die Hybridisierung hinsichtlich dieser zwei Faktoren optimiert. Das optimierte Verfahren war in der Lage, die Resistenz von *E. coli* bis zu einer Konzentration von 100 CFU/ml (*gyrA*) bzw. 1000 CFU/ml (*parC*) nachzuweisen. Außerdem war die Identifikation von resistenten *E. coli* in Anwesenheit eines zehnfachen Überschusses an sensitivem *E. coli* möglich. Unter der Verwendung von Hybridisierungsstationen konnte die gesamte Testdauer auf 3.5 Stunden (*gyrA*) bzw. 4.5 Stunden (*parC*) reduziert werden. Nach der erfolgreichen Vereinigung des *gyrA*- und *parC*-Arrays konnten Mutationen in beiden Genen gleichzeitig nachgewiesen werden. Das in dieser Arbeit entwickelte diagnostische Verfahren zur Bestimmung der Chinolonresistenz in *E. coli* bietet somit einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Diagnostik von Infektionskrankheiten des Urogenitaltrakts und wird zukünftig mit der Entwicklung eines kommerziellen Prototyps fortgesetzt.

Abstract

Quinolones are among the most potent antibacterial agents for use in human medicine. The resistance against fluoroquinolones has been increasing in accordance with the world wide use of this drug. *E. coli* is one of the most concerned species. Although *E. coli* strains are commonly susceptible to fluoroquinolones, it was observed, that the emergence of urinary-tract-derived strains with decreased susceptibilities to fluoroquinolones and fluoroquinolone treatment failures were associated. Therapeutic use of quinolones without considering the possible resistance of the infecting pathogen can lead to treatment failures as well as the induction of new resistances. A fast and precise diagnostic resistance test would be therefore of great value for the clinic. Up to now the standard methods to detect the antibiotic resistance take more than one day. Using microarray technology the test time can be shortened to a few hours. Besides this, the diagnostic on the molecular-level can be used for the monitoring of long time antibiotic treatment and for the investigation of resistance mechanisms.

In this study, a diagnostic microarray for single base mutation detection was developed, which can readily identify the most prevalent *E. coli* genotypes leading to quinolone resistance. Based on sequence analysis using public databases and our own DNA sequencing results, two amino acid positions (83 and 87) of the A subunit of the DNA gyrase (gene *gyrA*) and two amino acid positions (83 and 87) of the A subunit of the topoisomerase IV (gene *parC*), have been identified as mutation hotspots and were selected for the DNA-microarray detection. Oligonucleotide probes directed against these four positions were designed, so that they could cover the most important, resistance causing and silent mutations. The allele-specific oligonucleotide probe hybridisation and allele-specific primer extension were used respectively for the *gyrA* and the *parC* array. The performance of both arrays was validated using 36 clinical isolates of *E. coli* from four different hospitals in Germany. The microarray results were confirmed by standard DNA sequencing and were in full agreement with the phenotypic antimicrobial susceptibility testing.

In order to reduce the assay time and increase the sensitivity and specificity, the most important factors for a clinical application, the labelling PCR and array hybridisation were optimised. The optimised Assay was able to detect resistant *E. coli* in a concentration of 100 CFU/ml (*gyrA*) and 1000 CFU/ml (*parC*) respectively. Furthermore the identification of resistant *E. coli* in presence of a 10 fold excess of sensitive *E. coli* was possible. By using a hybridisation station the whole assay time could be reduced to 3.5 hours (*gyrA*) and 4.5 hours (*parC*) respectively. After the successful merging of the *gyrA* and *parC* array into a unified system, the mutations in both genes could be detected simultaneously. The diagnostic test developed in this study for the identification of quinolone resistances in *E. coli* offers therefore a promising approach for an optimisation of diagnosis of urogenital tract infections and will be continued within a commercial prototype development in the near future.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	<i>i</i>
Abstract	<i>iii</i>
Inhaltsverzeichnis	<i>v</i>
1 Einleitung	<i>1</i>
1.1 Mikrobielle Antibiotika-Resistenz	1
1.1.1 Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen	1
1.1.2 Chinolone	1
1.1.3 Mechanismus der Chinolon-Resistenz	3
1.1.4 Chinolon-Resistenz in <i>E. coli</i>	4
1.1.5 Aktuelle Methoden zur klinischen Diagnostik von mikrobielle Antibiotika-Resistenz	5
1.2 DNS-Mikroarrays	6
1.2.1 Prinzip	6
1.2.2 Mikroarray-Formate	8
1.2.2.1 Definition.....	8
1.2.2.2 Arrayherstellung	9
1.2.2.3 Immobilisierung der Sonden-DNS	10
1.2.2.4 Markierung der Ziel-DNS	11
1.2.3 Anwendungsgebiete	13
1.3 Methoden der SNP-Detektion mittels DNS-Mikroarrays	13
1.4 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Bioreagenzien	17
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.3 Geräte	18
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.4 Klinische Stämme	19
2.1.5 Software	19
2.1.6 Werkzeuge zur Programmierung.....	20
2.2 Lösungen	20
2.3 Methoden	21
2.3.1 DNS Isolierung und phänotypische Bestimmung	21
2.3.2 DNS Sequenzierung.....	21
2.3.3 Sondendesign	23
2.3.3.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	24
2.3.3.2 Clustalx	24
2.3.3.3 Interne Datenbank mit Annotation von Mutationen.....	24
2.3.4 Vorbereitung der Ziel-DNS	24
2.3.4.1 Amplifikation der Ziel-DNS	24
2.3.4.2 Aufreinigung des PCR-Produkts	26
2.3.4.3 Bestimmung von DNS-Konzentration und Einbaurate des Fluoreszenzfarbstoffes	26
2.3.4.4 Fragmentierung von Ziel-DNS.....	27
2.3.5 Arrayherstellung	27

2.3.5.1 Poly-L-Lysin-Objektträger	27
2.3.5.2 Epoxid-Objektträger	27
2.3.6 Hybridisierung	27
2.3.6.1 Hybridisierung im Hybridisierungssofen	28
2.3.6.2 Hybridisierung im Thermomixer	28
2.3.6.3 Hybridisierung in der Tecan HS400	28
2.3.7 Primer Extension	28
2.3.8 Arrayauswertung	29
2.3.8.1 Detektion des Fluoreszenzsignals	29
2.3.8.2 Datenverarbeitung	29
2.3.8.3 Automatisches Analyse-Programm	30
2.3.9 Bioinformatik	30
2.3.9.1 Betriebssystem und Webbrowser	30
2.3.9.2 WWW Server	30
2.3.9.3 Datenbankserver	30
2.3.9.4 Programmiersprachen	30
3 Ergebnisse.....	31
3.1 <i>gyrA</i>-Array	31
3.1.1 Sondendesign	31
3.1.2 Validierung der Sonden unter Verwendung von Poly-L-Lysin-Objektträgern	35
3.1.3 Prüfung des Arrays-Verhaltens unter Verwendung von Epoxid-Objektträgern	39
3.1.4 Optimierung des <i>gyrA</i> -Arrays auf Epoxid-Objektträgern	42
3.1.4.1 Optimierung der Markierungs-PCR	42
3.1.4.2 Optimierung der Hybridisierung	46
3.1.4.3 Vergleich von verschiedenen Hybridisierungsmethoden	52
3.1.5 Sensitivitätstest	53
3.1.6 Untersuchung von Mischproben	55
3.1.7 Untersuchung von aufgestockten Realproben mit <i>E. coli</i> in verschiedenen Verdünnungsstufen	56
3.2 <i>parC</i>-Array	59
3.2.1 <i>allele-specific oligonucleotide probe hybridisation</i> Methode	59
3.2.1.1 Sondendesign	59
3.2.1.2 Mikroarray-Ergebnisse	63
3.2.2 <i>allele-specific primer extension</i> Methode	65
3.2.2.1 Sondendesign	65
3.2.2.2 Entwicklung und Optimierung des Protokolls für ASPE	68
3.2.2.3 Sensitivitätstest	74
3.2.2.4 Validierung der Sonden	75
3.2.2.5 Untersuchung von Mischproben	79
3.2.2.6 Untersuchung von aufgestockten Realproben mit <i>E. coli</i> in verschiedenen Verdünnungsstufen	80
3.3 Vereinigung von <i>gyrA</i> und <i>parC</i>-Array	83
3.4 Chinolon-Resistenz Datenbank für die Mikroarray-Analyse von <i>E. coli</i>	84
3.4.1 Konzept	85
3.4.2 Parser	85
3.4.3 Lokale Datenbank	86
3.4.4 Analyse-Programm	87
3.4.5 Labor Information Managements System (LIMS)	88
3.4.6 Verifikation	89
4 Diskussion.....	91
4.1 Vergleich der phänotypischen und genotypischen Resistenzbestimmung	91
4.2 Vergleich der verschiedenen genotypischen Testverfahren	91
4.3 Sequenzanalyse und Sondendesign.....	93

4.3.1 Verschiedene Genotypen.....	94
4.3.2 Eigenschaften der Sonden	94
4.4 Array-Optimierung	96
4.4.1 Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Markierungs-PCR.....	97
4.4.2 Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Hybridisierung.....	97
4.4.3 Vergleich verschiedener Hybridisierungsmethoden.....	98
4.4.4 Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Primer-Extensions-Reaktion.....	99
4.5 Verschiedene Plattformen der Array-basierten SNP-Detektion	100
4.6 Mischung und Realproben.....	101
4.7 Klinische Isolate	101
4.8 Fazit.....	102
<i>Literaturverzeichnis</i>	<i>105</i>
<i>Anhang</i>	<i>115</i>
Abkürzungen.....	115
Sequenzen der QRDR der klinischen Isolate	116
Sequenzen von <i>gyrA</i>	116
Sequenzen von <i>parC</i>	119

1 Einleitung

1.1 Mikrobielle Antibiotika-Resistenz

1.1.1 Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen

Antibiotika werden eingesetzt, um bakteriell verursachte Erkrankungen zu behandeln. Dabei werden Bakterien entweder durch das Antibiotikum abgetötet oder in ihrer Vermehrung gehemmt. Bakterien sind jedoch von Natur aus sehr anpassungsfähig und können Abwehrstrategien entwickeln, die sie vor dem Antibiotikum schützen: sie werden somit resistent. Die Gefahr von Antibiotika-Resistenzen ist schon seit der Entdeckung der ersten antibakteriellen Wirkstoffe wie verschiedener Sulfonamide (1935) und Penicillin G (1940) erkannt worden. Die Ursache dieser Resistenzentwicklung sind Veränderungen des Genoms durch Mutationen oder Erwerb von Genen aus anderen Mikroorganismen mittels verschiedener Übertragungsmechanismen.

Die Veränderungen der genetischen Information können über drei Mechanismen zur Resistenz führen: 1. Antibiotika können durch von Bakterien produzierte Enzyme inaktiviert werden. Ein Beispiel ist die hydrolytische Spaltung der Beta-Lactam-Antibiotika wie Penicilline durch Beta-Lactamasen. 2. Die Zielstruktur wird durch Mutationen verändert, so dass die Affinität des zugehörigen Antibiotikums erheblich abnimmt. So kann Streptomycin nicht oder nur mit geringer Affinität an mutierte ribosomale Proteine binden. 3. Veränderungen der Membranzusammensetzung oder Porinen führen zur verringerten Aufnahme von Antibiotika in die Zelle. Überexpression von Effluxpumpen führt zur aktiven Ausschleusung der Substanzen aus der Zelle. Diese Mechanismen sind für eine geringe Akkumulation von Antibiotika verantwortlich und führen meist zu Multiresistenzen.

Die zunehmende Resistenzentwicklung gegen Antibiotika bei Bakterien ist offensichtlich: 1944, im Jahre der erstmaligen Verwendung von Penicillin, waren fast alle Stämme von *Staphylococcus aureus* gegen das neue Medikament empfindlich. 1950 reagierten hingegen nur noch 30% der klinischen Isolate dieses Infektionserregers auf Penicillin und zur Zeit liegt der entsprechende Wert bei 15%¹⁷. Im Verlauf der Zeit entwickelten Bakterien auch Mehrfachresistenzen. Solche Bakterienstämme stellen eine besondere Bedrohung dar. Resistente Bakterien kommen in der Natur häufig vor. Wesentlich mitverantwortlich für die Bildung von Resistenzgenen bei Bakterien ist aber der Einsatz von Antibiotika durch den Menschen. Die Zunahme der resistenten Stämme ist auf einen unsachgemäßen Gebrauch von Antibiotika zurückzuführen, in erster Linie in der Humanmedizin. Der durch Antibiotika auf Bakterien ausgeübte Selektionsdruck ist am stärksten in Krankenhäusern.

1.1.2 Chinolone

Chinolone sind Breitbandantibiotika und gelten daher bei verschiedenen Krankheiten als Medikament erster Wahl. Chinolone und abgeleitete Derivate (Naphthyridin) sind synthetische Verbindungen (Abbildung 1.1), die sich nicht von

einer natürlich vorkommenden Struktur ableiten lassen. Nalidixinsäure wurde als erstes Chinolon 1962 in den Markt eingeführt⁴⁹ und wurde nur zur Behandlung von Harnwegsinfektionen eingesetzt. Nach der Einführung ist diese Substanzklasse schrittweise weiter optimiert worden. Durch die Einführung eines Piperazinrestes an Position C7 konnte das Wirkungsspektrum ausgedehnt werden⁷⁹. Der entscheidende Fortschritt war die zusätzliche Fluorierung der C6-Position der Chinolon-Grundstruktur. Norfloxacin ist die Ausgangssubstanz der modernen Fluorchinolone. Fluorchinolone wurden nach der Einteilung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft in vier Gruppen aufgeteilt (Tabelle 1.1). Während die Gruppe I der Chinolone nur den Einsatz bei Harnwegsinfektionen rechtfertigt, sind in der Gruppe II die systemisch anwendbaren Fluorchinolone enthalten, die über eine gute antibakterielle Aktivität und ein breites Wirkspektrum verfügen. Hierzu gehören Enoxacin, Fleroxacin, Ofloxacin und Ciprofloxacin. Die dritte Gruppe umfasst Antiinfektiva mit verbessertem Wirkspektrum im grampositiven und atypischen Bereich. Hier befinden sich Levofloxacin, Sparfloxacin und Grepafloxacin. Die vierte Gruppe umfasst die Substanzen mit verbesserter Wirkung gegen grampositive und atypische Keime und mit Wirkung gegen Anaerobier. Zu diesen Antibiotika gehören Trova- und Moxifloxacin. In Abbildung 1.2 sind Strukturformeln verschiedener Fluorchinolone dargestellt.

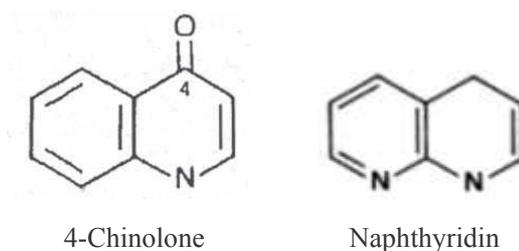


Abbildung 1.1: Chemische Struktur von Chinolonen und deren Derivaten

Tabelle 1.1: Einteilung der Fluorchinolone nach Gruppen (Listung innerhalb einer Gruppe nach aufsteigender In-vitro-[MHK]-Aktivität)⁶⁰

I. Orale Fluorchinolone mit im wesentlichen auf Harnwegsinfektionen eingeschränkter Indikation (D)	Narfloxacin Pefloxacin
II. Systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breiter Indikation	Enoxacin Fleroxacin Ofloxacin Ciprofloxacin
III. Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und „atypische“ Erreger	Levofloxacin Sparfloxacin Grepafloxacin
IV. Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und „atypische“ Erreger sowie gegen Anaerobier	Gatifloxacin* Trovafoxacin* Moxifloxacin* Clinafloxacin*

* Substanzen, die sich noch in klinischer Prüfung (Phase III) befinden bzw. zur Zulassung

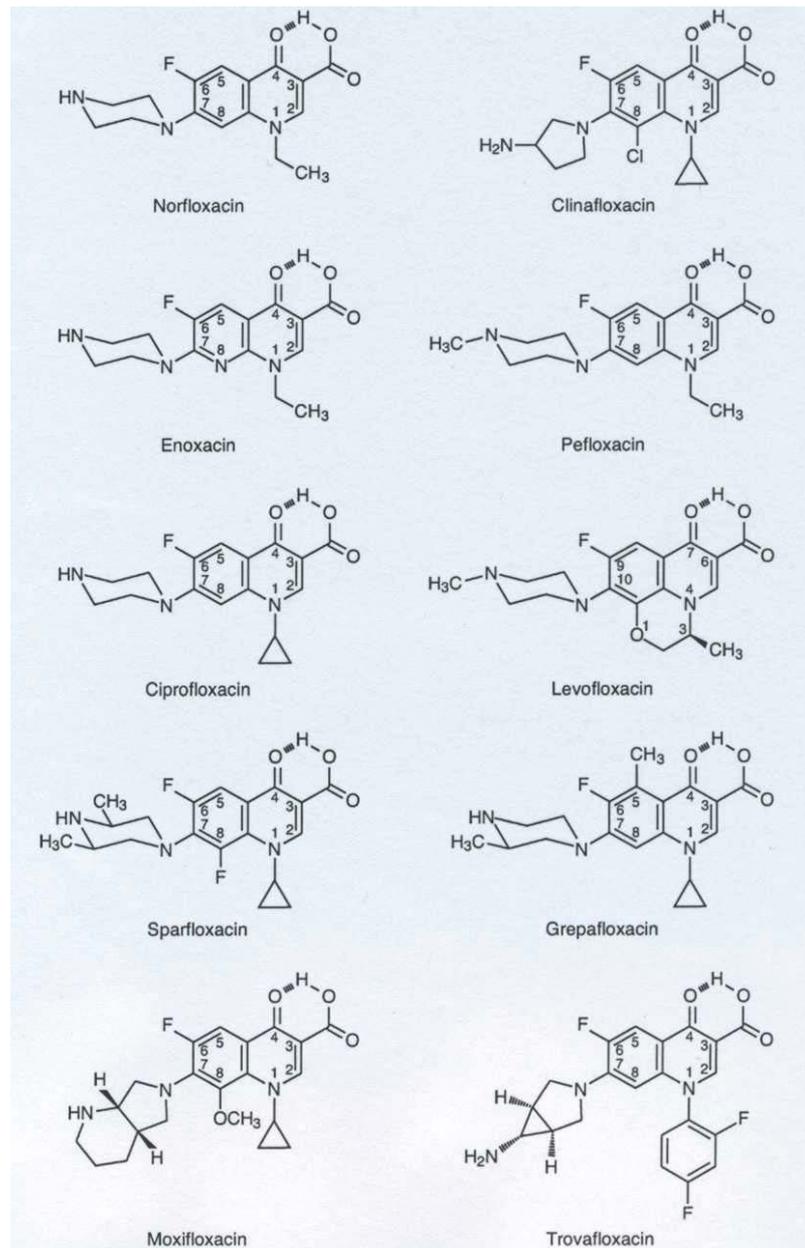


Abbildung 1.2: Strukturformeln verschiedener Fluorchinolone

1.1.3 Mechanismus der Chinolon-Resistenz

Für die Humanmedizin gehören Chinolone zu den leistungsfähigsten Antibiotika. Etwa 11% der globalen verschriebenen Antibiotika sind Fluorchinolone⁴³. Die Resistenz gegen Chinolone hat sich wegen der weltweiten Verwendung dieser Substanz erhöht. Chinolone wirken bakterizid³⁵. Die Zielmoleküle der Chinolone sind die Gyrase und die Topoisomerase IV, die zu den Typ-II-Topoisomerasen gehören. Das primäre Ziel bei gramnegativen Bakterien ist die Gyrase und bei grampositiven Bakterien die Topoisomerase IV. Chinolone binden spezifisch an den DNS-Enzym-Komplex, wodurch ein ternärer Komplex aus DNS, Gyrase/Topoisomerase IV und Chinolon entsteht. Dieser Komplex ist so stabil, dass die normale Funktion der Enzyme nicht erfüllt werden kann. Diese beiden Enzyme sind unerlässlich für die DNS-Synthese. Die

Gyrase überführt die ringförmige DNS von Bakterien aus dem energiearmen, relaxierten Zustand unter Verbrauch von ATP in einen energiereichen, negativ überspiralisierten Zustand. Aufgrund des DNS-Enzym-Komplexes kann die Replikation der DNS jedoch nicht stattfinden. Die Topoisomerase IV ist notwendig für die Trennung der replizierten Tochterchromosomen. Dieser Prozess wird ebenfalls durch den DNS-Enzym-Komplex verhindert. Damit kommt es nicht zur Verteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen. Die Hemmung dieser zwei lebensnotwendigen Enzyme durch Chinolone führt zum Zelltod.

Bisher gibt es keine Hinweise auf plasmidgebundene Resistenz gegen Chinolone, außer einem einzigen Bericht aus den USA für *Klebsiella pneumoniae*⁹⁴. Zwei Mechanismen sind bekannt, die zur Chinolon-Resistenz führen können: Die Veränderung der Zielmoleküle, d.h. der Gyrase und der Topoisomerase IV, und die verringerte Konzentration der Chinolone gegenüber den Zielmolekülen. Die Veränderung der Zielmoleküle wird durch Punktmutationen im Gyrase- und Topoisomerase IV-Gen erreicht, wobei die Untereinheiten A (*gyrA* bei der Gyrase, *parC* bei der Topoisomerase IV) am häufigsten betroffen sind. Die meisten Mutationen befinden sich innerhalb der so genannten QRDR (*Quinolone resistance determining region*) beider Enzyme. Solche Mutationen verändern die Struktur der Enzyme, damit Chinolone nicht an den DNS-Enzym-Komplex binden können. Daher wird auch kein stabiler ternärer Komplex gebildet. Die Vermehrung der Bakterienzellen findet statt: somit sind die Bakterien resistent gegen Chinolone. Neben den Mutationen in den Genen für die Zielenzyme wurden auch andere Mutationen entdeckt, die zur Verringerung der Konzentration von Chinolonen in der Zelle führen. Beispiele dafür sind *mex*-Effluxpumpen¹⁰⁰ bei *Pseudomonas aeruginosa* und *norA*⁸⁴ bei *Staphylococcus aureus*. Solche Mutationen verursachen gleichzeitig eine verringerte Empfindlichkeit für andere Antibiotika, wie z.B. Beta-Lactame oder Rifampicin. Durch den zweiten Mechanismus wird die Chinolon-Resistenz meistens nur um ein bis zwei Stufen erhöht. Erst wenn die beiden Mechanismen zusammenwirken, haben sie einen schwerwiegenden Effekt auf die Resistenz.

1.1.4 Chinolon-Resistenz in *E. coli*

E. coli ist eine der von Chinolon-Resistenz am meisten betroffene Spezies. Bei Harnwegsinfektionen ist *E. coli* der Haupterreger. Die für die Behandlung eingesetzten Antibiotika sind zu 90 % Chinolone. Indes sind schon 7 - 9 % der *E. coli* gegen Chinolone resistent. Außerdem können Chinolon-resistente *E. coli* eine potentielle Bedrohung für Leukämie-Patienten sein, denen Chinolon-Antibiotika als Vorbeugungsmaßnahme verschrieben werden¹⁰¹. Obwohl die beiden oben genannten Resistenzmechanismen in *E. coli* vorkommen, spielt nur der Hauptmechanismus mit (die Mutationen auf dem Zielenzym-Gen) eine entscheidende Rolle für die Resistenzentwicklung. Das primäre Zielenzym ist die Gyrase. Mutationen in der Gyrase-Untereinheit A (*gyrA*) werden für den Hauptgrund von Chinolon-Resistenzen gehalten^{23,24,71,80}. Die QRDR¹⁰² liegt zwischen der Nukleotidposition 199 und 318, welche den Aminosäurepositionen Ala67 und Gln106 entspricht. Die am häufigsten betroffenen Positionen sind die Aminosäurepositionen Ser83 und Asp87 (hernach bezieht sich die Positionsangabe immer auf die Aminosäureposition). Die Topoisomerase IV ist das sekundäre und weniger sensitive Ziel von Chinolonen⁹². Bisher wurden nur Mutationen in diesem Enzym gefunden, wenn mindestens eine begleitende Mutation in der Gyrase vorlag. Die Sequenzen der beiden Enzyme sind

homolog, besonders am N-Terminus, wo die QRDR lokalisiert ist. Die QRDR von *parC* ist lokalisiert zwischen den Nukleotidpositionen 190 und 309, welche den Aminosäurepositionen Ala64 und Gln103 entspricht. Die am häufigsten mutierten Positionen sind Ser80 und Glu84. Diese Mutationen sind für die Resistenz mit höherem MHK-Wert (Minimale Hemmkonzentration) verantwortlich^{8,39}. Die Mutationen in dieser beiden Genen finden schrittweise statt, wobei die erste Mutation immer Ser83 ist⁷.

1.1.5 Aktuelle Methoden zur klinischen Diagnostik von mikrobielle Antibiotika-Resistenz

Die Standardmethoden zur Resistenz-Detektion in der Klinik sind Agardiffusionstest, Mikrobouillondilutionstest oder E-Test (Abbildung 1.3). Der Agardiffusionstest ist eine einfache Empfindlichkeitsprüfung. Der zu untersuchende Erreger wird auf einer Agarplatte ausgestrichen. Auf diese Agarplatte werden Antibiotikatestplättchen mit einer definierten Konzentration von Antibiotika aufgesetzt. Anhand der Größe der sich bildenden Hemmhöfe um die Plättchen herum kann die Wirksamkeit der Antibiotika beurteilt werden. Es erfolgt eine Beurteilung der Hemmhöfe nach NCCLS (US-amerikanische Norm) als sensibel, intermediär oder resistent. Bei dem Mikrobouillondilutionstest handelt es sich um ein Standardverfahren zur Empfindlichkeitsprüfung bei aeroben grampositiven und gramnegativen Bakterien. Das zu untersuchende Bakterium wird in einer Bouillon suspendiert. Diese Bouillon wird in eine mit verschiedenen Konzentrationen von Antibiotika vorbeschichtete Testplatte gegeben. Nach einer Bebrütung über Nacht kann das Wachstum der Bakterien innerhalb der einzelnen Vertiefungen optisch (und photometrisch) abgelesen werden und so die MHK für die einzelnen Antibiotika bestimmt werden. Der E-Test ist ein kostenintensives Verfahren, das zur Testung von anaeroben und anspruchsvoll wachsenden Bakterien sowie für Hefen eingesetzt wird. Der zu untersuchende Erreger wird auf einer Agarplatte ausgestrichen. Auf diese Agarplatte wird ein mit einem Antibiotikagradierten beschichteter E-Test-Streifen aufgelegt. Die Antibiotika auf dem Streifen bewirken eine ellipsenförmige Wachstumshemmung des Erregers, so dass eine MHK an dem Streifen abgelesen werden kann. Alle drei Methoden basieren auf der phänotypischen Bestimmung. Die phänotypische Bestimmung solcher Tests ist nicht ausreichend sensitiv und zeitaufwendig. Die Analyse kann von einem Tag bis zu mehreren Tagen in Anspruch nehmen, da sie vom Wachstum der Bakterien abhängig ist. Ein besonderes Problem stellen unkultivierbare Bakterien dar, wie *Mycoplasma haemofelis* oder *Helicobacter heilmannii*^{19,104}. Häufig wird eine empirische Therapie bereits begonnen, bevor das Ergebnis des diagnostischen Labors vorliegt⁵. In folge dessen könnte der Patient zunächst mit ein unwirksamen Antibiotikum behandelt werden, gegen das die krankheitsverursachenden Bakterien bereits resistent sind. Diese falsche Behandlung kann sowohl zur Verschlechterung des Patientenzustands führen, als auch neue Resistenzen induzieren⁹. Die Chinolon-Resistenz ist hierfür ein Beispiel. Viele in vitro Studien zeigen, dass durch die Zugabe von Chinolonen in Bakterienkulturen mit einem niedrigen MHK-Wert, resistente Bakterien mit einem höheren MHK-Wert selektiert werden können^{6,38,40}. Dies spricht für die Theorie, dass die *gyrA* oder *parC* abhängige Chinolon-Resistenz eine Folge der Selektion der natürlich aufgetretenen Mutationen in einer bestimmten mikrobiellen Population ist^{50,70}.

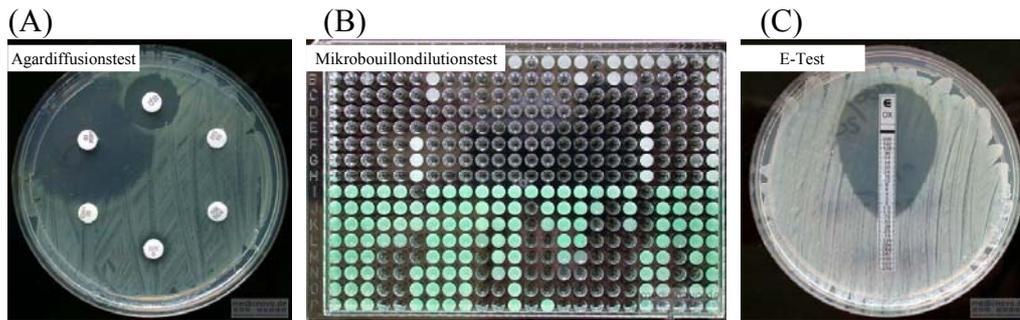


Abbildung 1.3: Bilder der verschiedenen Verfahren zur Resistenz-Detektion [www.uni-ulm.de]. (A) Agardiffusionstest; (B) Mikrobouillondilutionstest; (C) E-Test

Eine schnelle und genaue genotypische Methode kann für die Diagnose der Resistenz in der Klinik von großem Nutzen sein. Daher wurden für die Detektion der Chinolon-Resistenz einige molekularbiologische Techniken zum Nachweis von Mutationen in der QRDR eingesetzt, z.B. *single-strand conformational polymorphism* (SSCP) Analyse⁶⁶, *mismatch amplification mutation assay* (MAMA)⁷² und *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) Analyse³³. Alle diese Methoden haben Beschränkungen in verschiedener Hinsicht und wurden nicht in der klinischen Diagnostik etabliert. Einige gemeinsamen Nachteile sind:

- stille Mutationen können sich nicht von *missense* Mutationen unterscheiden werden;
- der genaue Nukleotidaustausch bleibt unbekannt;
- die Multiplexkapazität ist sehr beschränkt.

Eine andere Methode zur Detektion der Punktmutation ist die Sequenzierung. In den meisten Fällen sind die Mutationen aber bekannt, daher ist es nicht notwendig diese zeit- und kostenaufwändige Prozedur durchzuführen. Als vielversprechende Alternative bietet sich ein DNS-Mikroarray für die Detektion der durch Mutationen verursachten Resistenz an.

1.2 DNS-Mikroarrays

1.2.1 Prinzip

Beim DNS-Mikroarray (auch Bio- oder DNS-Chip genannt) handelt es sich um eine systematische Anordnung von DNS-Molekülen mit bekannten Sequenzen (Sonden) auf einer planaren Oberfläche (z.B. Glas-Objektträger). Bei einer Exposition mit der zu untersuchenden Nukleinsäure (Ziel-DNS) hybridisieren die komplementären Nukleinsäure-Abschnitte an die Festphasen-gebundenen Sonden. Ein einziger Mikroarray kann mit Tausenden verschiedener Sonden bedruckt sein, die ebenso viele unterschiedliche komplementäre DNS-Sequenzen erkennen. Um die Hybridisierung sichtbar zu machen, muss dabei die Ziel-DNS markiert vorliegen. Die Ziel-DNS kann beispielsweise fluoreszenzmarkierte cDNS sein, die durch *reverse* Transkription von mRNA erzeugt wird. PCR-Fragmente, unter Verwendung von markierten Desoxynucleosid-Triphosphaten (dNTP) erzeugt, können auch als Ziel-DNS eingesetzt werden. Die nicht-hybridisierte Ziel-DNS wird durch einen Waschschritt entfernt. Durch die Hybridisierung entsteht auf dem DNS-Mikroarray ein charakteristisches Hybridisierungsmuster, welches fluorimetrisch ausgelesen werden kann.

Der Verlauf eines Mikroarray-Experiments ist in Abbildung 1.4 schematisch dargestellt. Im weiteren Sinn war der *Southern blot* die erste Array-Methode, die auf demselben Funktionsprinzip basiert, nämlich der Hybridisierung. Theoretischer Hintergrund zur Hybridisierungskinetik ist das Zusammenlagern zweier komplementärer Einzelstränge zu einem Doppelstrang (Hybride). Die Stabilität eines Hybrids wird vom Schmelzpunkt (T_m) bestimmt. Bei dieser Temperatur (T_m) liegt die Hälfte der Hybride einzelsträngig vor. Der Schmelzpunkt eines Hybrids ist abhängig von der Salzkonzentration (hohe Ionenkonzentration stabilisiert die Hybride), dem GC-Gehalt der Hybride (hoher GC-Gehalt stabilisiert die Hybridisierung), der Länge der kürzesten Sequenz innerhalb der Hybride, und der Konzentration an Hybriddestabilisierenden Agenzien (wie Formamid). Durch Einstellung dieser Faktoren kann eine exakt komplementäre Hybridstruktur von Hybriden mit nicht perfekter Basenpaarung unterschieden werden. Somit können die Sequenzen mit einem einzigen Basen-Unterschied, z.B. einer Punktmutation, auseinander gehalten werden. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzungen der Sonden ist es generell schwierig eine optimale Hybridisierungstemperatur für alle Sonden zu finden, die sich auf einem Array befinden⁸³. Ein anderer Faktor, der die Hybridisierung beeinflussen kann, ist die Sekundärstruktur der Ziel-DNS⁸². In diesem Fall ist die Zielsequenz für intermolekulare Basenpaarung nicht mehr zugänglich. Fragmentierung der Ziel-DNS kann diesen Effekt reduzieren.

Die DNS-Chiptechnologie ermöglicht es einerseits, eine sehr große Anzahl an Hybridisierungen gleichzeitig durchzuführen – dies ist bedingt durch die Vielzahl verschiedener Sonden innerhalb eines Arrays. Zusätzlich lässt sich durch die systematische Anordnung der Sonden das Ergebnis aller Hybridisierungen auch simultan analysieren. Dieser hohe Parallelisierungsgrad ist einer der wesentlichen Vorteile dieser Technik gegenüber den klassischen molekularbiologischen Methoden.

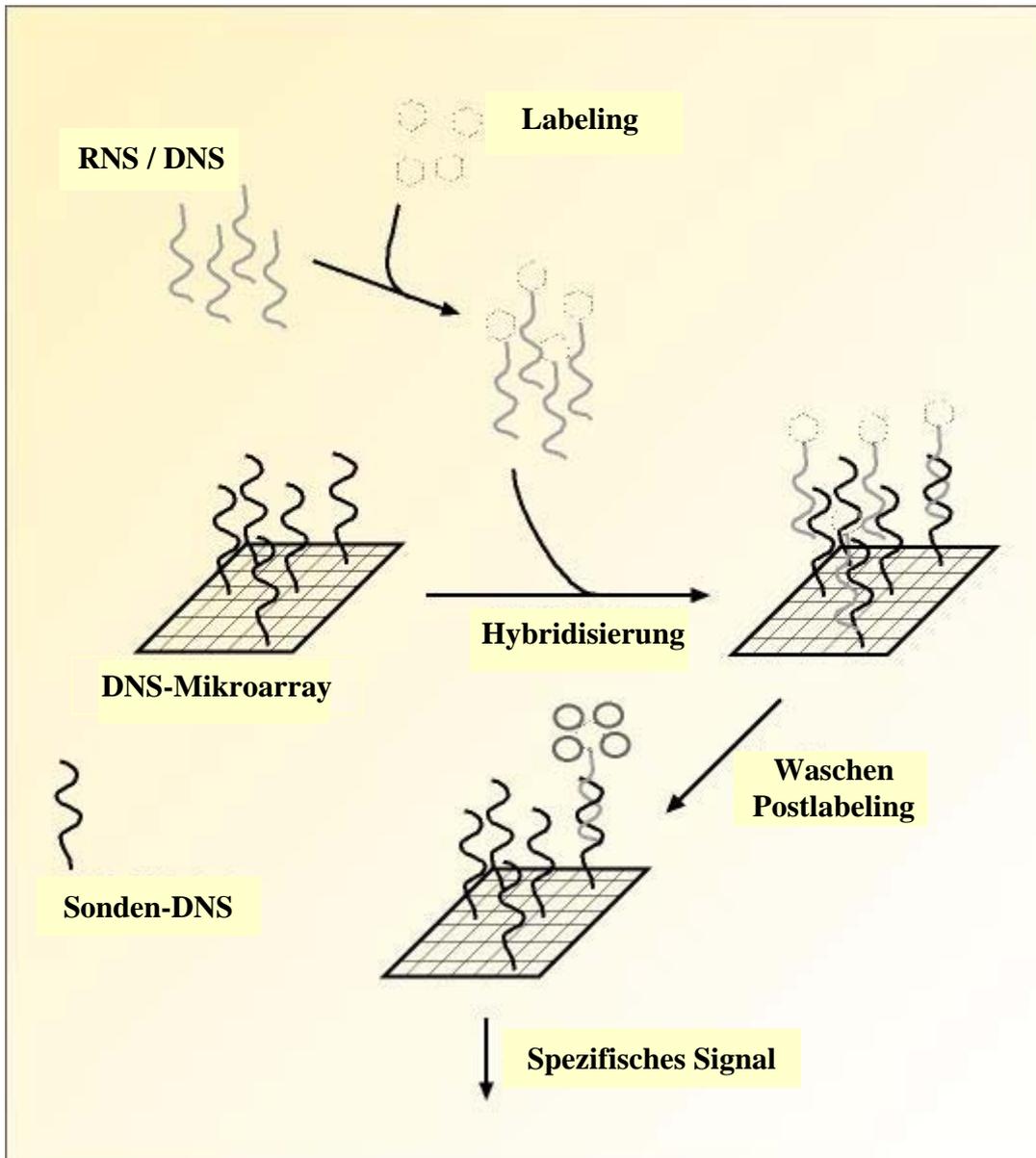


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Ablaufs eines Mikroarray-Experiments

1.2.2 Mikroarray-Formate

1.2.2.1 Definition

Arrays können aufgrund ihrer Dichte in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Ein Makroarray hat weniger als 500 Spots/cm² („Features“/cm²), hingegen hat ein Mikroarray mehr als 500 Spots/cm². Diese Grenzwerte sind im Affymetrix „GeneChip“ Patent¹ definiert. Ein Mikroarray wird entweder durch das Aufbringen von vorsynthetisierten Sonden oder durch *in situ* Synthese hergestellt. Glas oder Membran kann als Träger verwendet werden. Je nach Anwendung können cDNS (0.5-2.0 kb), neudings auch „Langmere“ (60 nt) oder Oligonukleotide (10-25 nt) als Sonden eingesetzt werden. Der entsprechende Mikroarray wird daher cDNS-Mikroarray oder Oligonukleotid-Mikroarray genannt. cDNS-Sonden werden durch enzymatische

Reaktion hergestellt, wie z.B. PCR oder *reverse* Transkription. Oligonukleotid-Sonden werden entweder *in situ* synthetisiert oder vorsynthetisiert. Neben den weit verbreiteten DNS-Sonden, ist auch synthetische Nukleinsäure PNA (*peptide nucleic acid*) im Einsatz, die wegen des ungeladenen Gerüsts eine höhere Hybridisierungseffizienz aufweist⁹⁶. Außerdem ermöglicht ein PNA-Array den Einsatz von nicht markierter Ziel-DNS¹⁵. Die Detektion des Hybridisierungsereignisses erfolgt durch die Massenspektroskopie oder die Visualisierung der Phosphatgruppe, einem Bestandteil der Nukleinsäure, der aber bei PNA nicht vorhanden ist. Zur Zeit ist diese Methode aber noch in der Experimentalphase. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung eines Nukleotid-Analogs, z.B. Inosin, eine so genannte universelle Base (Abbildung 1.5). Diese universelle Base kann mit jeder natürlichen Base eine Basenpaarung bilden. Aufgrund dieser Fähigkeit kann sie an Positionen von PCR-Primern oder DNS-Sonden eingesetzt werden, an der die Nukleotid-Komposition mehrdeutig ist (*ambiguous codon position*)⁵¹.

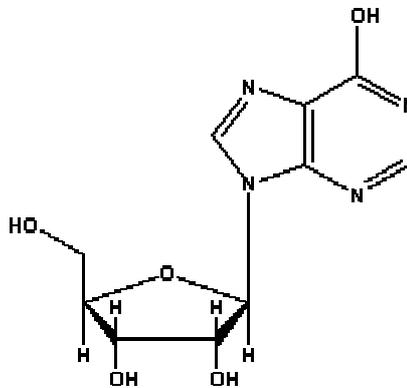


Abbildung 1.5: Strukturformel von Inosin

1.2.2.2 Arrayherstellung

Photolithographische Verfahren werden meist bei der *in situ* Synthese angewandt. Die mit einer photosensitiven Schutzgruppe gekoppelten synthetischen Linker werden zunächst auf einem Glasträger verankert. Belichtung an ausgewählten Stellen zieht eine positionsabhängige Freisetzung von reaktiven Gruppen nach sich. An diesen Stellen können im anschließenden Schritt Desoxynukleotide kovalent binden. Die Hydroxylgruppen dieser Nukleotidbausteine sind wiederum durch photosensitive Gruppen geschützt. Dieser Freisetzungsprozess reaktiver Gruppen durch Belichtung und die anschließende chemische Synthese werden mehrmals wiederholt, wodurch jeweils andere Positionen aktiviert werden und unterschiedliche Nukleotide für die Kopplungsreaktion verwendet werden. Zum Schluss können Oligonukleotide jeder beliebiger Sequenz an jeder Stelle synthetisiert werden. Affymetrix ist der Pionier auf diesem Gebiet⁶⁹. Sie benutzt photolithographische Masken, die auch für die Herstellung von Halbleiter-Chips verwendet werden, um DNS-Mikroarrays mit sehr hoher Dichte zu produzieren. NimbleGen entwickelte ein maskenloses Verfahren (computergesteuerte Mikrospiegel) um die auf Photolithographie basierte chemische Synthese zu ermöglichen. Ein anderes Verfahren zur *in situ* Synthese ist die *ink-jet printing* Technologie¹³, welche die nasschemische Oligonukleotid-Synthese verwendet. Die beteiligten Firma sind Hewlett Packard, Rosetta und andere.

Für das Aufbringen von vorsynthetisierten Sonden auf Trägern stehen einige Methoden zur Verfügung, wobei alle Methoden auf das von Pat Brown und Ron Davis⁷⁶ entwickelte Druck-Verfahren zurückzuführen sind. Sowohl das Kontakt- als auch das Nicht-Kontakt-Verfahren werden hier benutzt. Verschiedene Technologien wurden hierfür entwickelt. Beispiele dafür sind *solid pin* (V-P Scientific), *split pin* (Brown Labor), *ring* und *pin* System (Affymetrix) für Kontakt-Drucken, und *piezo spray* (Rosetta) für Nicht-Kontakt-Drucken.

Eine ganz anderes Format stellt der sogenannte *active chip* dar^{31,73}, der sowohl das Aufbringen von vorsynthetisierten Sonden als auch den Hybridisierungsprozess elektronisch steuert. Damit kann für jede Sonde eine andere Hybridisierungsbedingung verwendet werden und daher werden alle Sonden unter optimalen Bedingungen hybridisiert.

1.2.2.3 Immobilisierung der Sonden-DNS

Zur Immobilisierung der vorsynthetisierten Sonden wird der Glasträger mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen beschichtet, wie Amino-, Aldehyd- und Epoxid-Gruppen. Die Koppelung der DNS erfolgt entweder über endständig angefügte Amino-Gruppen (aminomodifizierte DNS-Sonden) oder über reaktive Bindungen in der DNS selbst. Kovalente endständige Immobilisierung durch einer aminomodifizierten DNS-Sonde erlaubt eine gute Zugänglichkeit der Sonde bei der Hybridisierung. Für eine Immobilisierung der DNS-Sonden auf einem mit Amino-Gruppen beschichteten Glasträger lagert sich zunächst die DNS über ionische Bindung an der Oberfläche. dann wird die DNS über eine UV induzierte Radikal-Reaktion kovalent an der Oberfläche des Glasträgers gebunden (Abbildung 1.6).

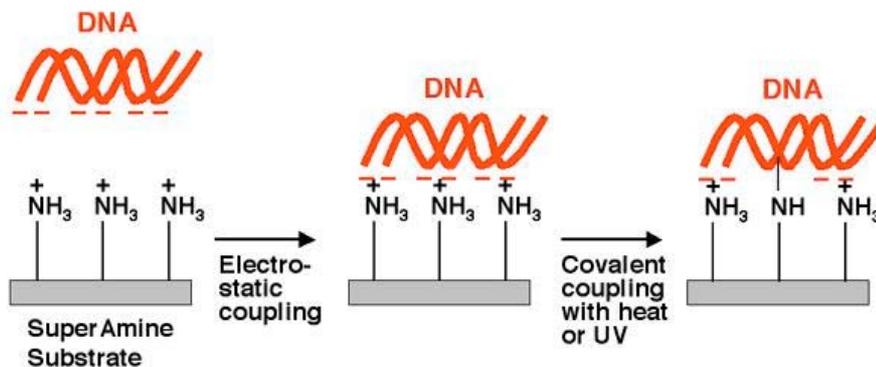


Abbildung 1.6: Immobilisierung von DNS-Sonden auf einem mit Amino-Gruppen beschichteten Objektträger (z.B. Poly-L-Lysin) [www.arrayit.com].

In Abbildung 1.7 wird die Immobilisierung der DNS-Sonden auf einer mit Aldehyd-Gruppen beschichteten Oberfläche schematisch dargestellt. DNS-Sonden, die mit einer Amino-Gruppe am 3' oder 5' Ende ausgestattet sind, können durch einen nukleophilen Angriff auf das Aldehyd eine kovalente Bindung ausbilden. Bei Dehydrierung erfolgt die Bindung durch Bildung einer Schiff'schen Base.

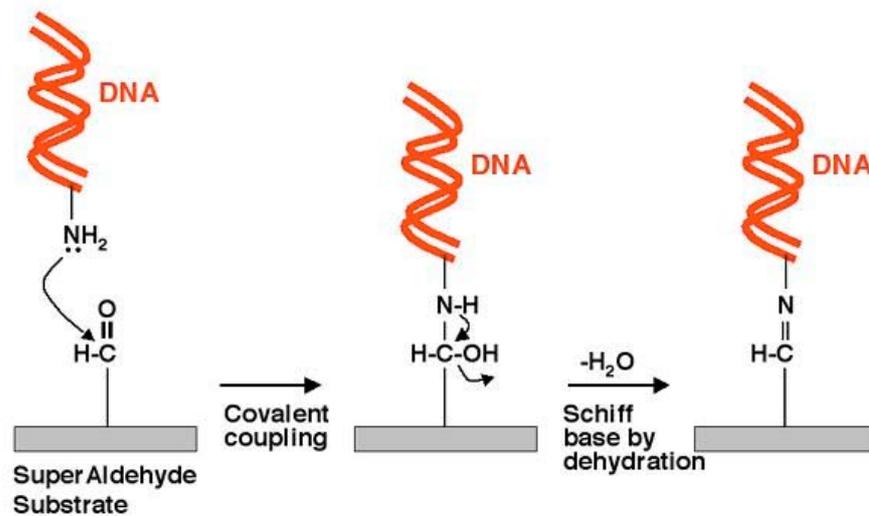


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der endständigen Immobilisierung von aminomodifizierten DNS-Sonden auf einem mit Aldehyd-Gruppen beschichteten Objektträger [www.arrayit.com].

Die Immobilisierung auf einer Epoxid-Oberfläche zeigt Abbildung 1.8. Das freie Elektronenpaar der primären Amino-Gruppe des Oligonukleotids greift das elektrophile Kohlenstoff-Atom der Epoxid-Gruppe an und bildet dabei eine kovalente Bindung aus. Für eine bessere Zugänglichkeit der an der Festphase gebundenen Sonden gegenüber der sich in Lösung befindenden Ziel-DNS kann ein Abstandhalter (so genannt *spacer*) an einem Ende der Sonden angebracht werden⁸².

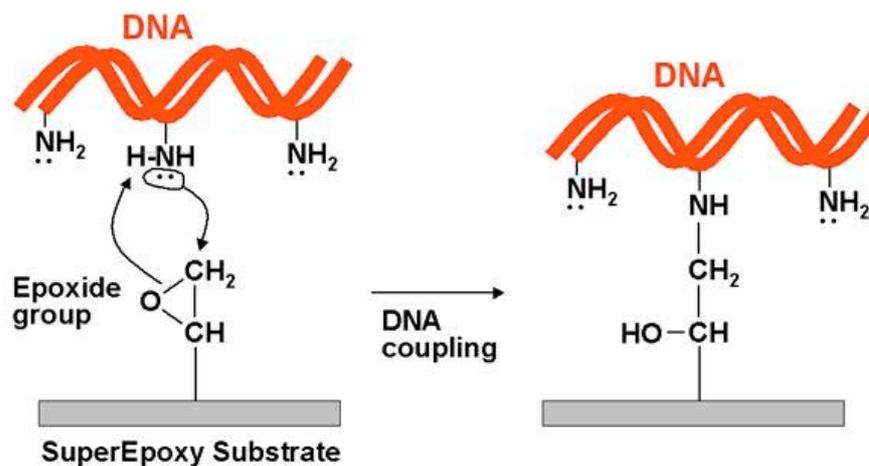


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Immobilisierung von DNS-Sonden auf einem mit Epoxid-Gruppen beschichteten Objektträger [www.arrayit.com].

1.2.2.4 Markierung der Ziel-DNS

Für die Markierung der Ziel-DNS wird entweder eine radioaktive Substanz oder ein Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, wobei aus Sicherheitsgründen und zur Erleichterung der Durchführung meist nur die Fluoreszenzmarkierung verwendet wird. Die am häufigsten benutzten Fluoreszenzfarbstoffe sind Cyaninfarbstoffe, Cy3 und Cy5. Das Anregungsmaximum von Cy3 bzw. Cy5 liegt bei 548 nm bzw. 646 nm und das

Ausstrahlungsmaximum liegt bei 562 nm bzw. 664 nm (Abbildung 1.9). Abbildung 1.10 zeigt die Strukturen der Cyaninfarbstoffe. Als Alternative bieten sich Alexa Fluor® 555 und Alexa Fluor® 647 an, die von *Molecular Probes* kommerziell vertrieben werden.

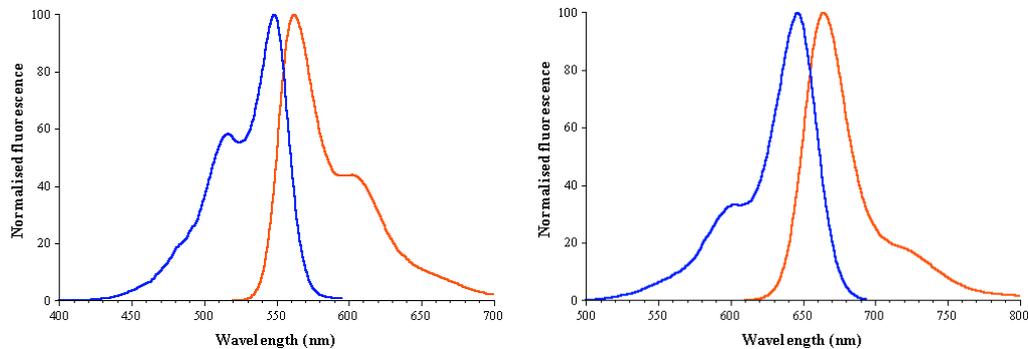


Abbildung 1.9: Anregungs- und Ausstrahlungsspektren von Cy3 (links) und Cy5 (rechts) [Amershambiosciences]

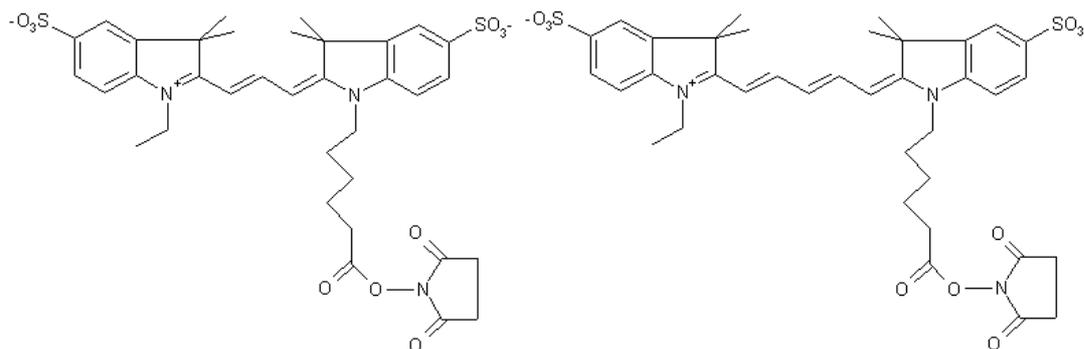


Abbildung 1.10: Chemische Strukturen von Cy3 (links) und Cy5 (rechts) NHS-Ester

Der Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffs kann sowohl direkt (*direct labeling*) als auch indirekt (*indirect labeling*) erfolgen. Bei einer direkten Markierung wird ein mit Fluoreszenzfarbstoff modifiziertes Nukleotid eingesetzt, das durch eine enzymatische Reaktion wie PCR oder *reverse* Transkription in die Ziel-DNS eingebaut wird. Die Einbaurrate kann über das Verhältnis von markiertem zu nicht markiertem Nukleotid reguliert werden. Um unterschiedliche Einbauraten wegen der verschiedenen Strukturen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden, wird in der Expressionsanalyse häufig indirekte Markierung eingesetzt. Dabei wird ein Aminoallyl-modifiziertes Nukleotid⁸⁵ statt des mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Nukleotids während der PCR verwendet. Die Koppelung des aktiven Fluoreszenzfarbstoffes an der Aminogruppe des bereits in die Ziel-DNS eingebauten Aminoallyl-modifizierten Nukleotids findet durch chemische Reaktion statt. Eine andere Variante der indirekten Markierung ist die Verwendung von Biotin-modifizierten Nukleotiden in der PCR Reaktion. Die Koppelung der Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate am Biotin-modifizierten Nukleotid erfolgt in einem Posthybridisierungsprozess.

Die Detektion eines Fluoreszenzsignals erfordert entweder einen Laserscanner oder CCD (*charge-coupled device*) –basiertes Detektionssystem. Der Laserscanner regt den Fluoreszenzfarbstoff bei seiner Anregungswellenlänge an und misst das Signal bei seiner Ausstrahlungswellenlänge, wobei für unterschiedlich markierte Ziel-DNS verschiedene Laser verwendet werden. Das Scannen kann gleichzeitig oder nach einander erfolgen. Das CCD-basierte Detektionssystem funktioniert ähnlich wie eine CCD-Kamera. Dabei werden mehrere Ausschnitte des Fluoreszenzbildes, miteinander verbunden und zu einem Ganzen zusammengesetzt. Der Laserscanner kann mehr Energie zur Anregung fokussieren, d.h. auch mehr Licht in kurzer Zeit einsammeln. Daher ist die Detektion beim Laserscanner schneller als beim CCD-basierten Detektionssystem.

1.2.3 Anwendungsgebiete

Das größte Anwendungsgebiet von DNS-Mikroarrays liegt im medizinischen Bereich. Zwei Hauptapplikationen sind die Erstellung von Expressionsprofilen bzw. die Mutationsdetektion, wobei jeweils cDNS-Mikroarrays bzw. Oligonukleotid-Mikroarrays verwendet werden. Das Expressionsprofil aller Gene eines Organismus, eines Gewebes, oder eines Zelltyps kann durch DNS-Mikroarrays bestimmt werden. Dadurch kann eine quantitative Aussage über das Expressionsniveau der Gene eines gesamten Genoms gewonnen werden. Dies ermöglicht die Identifikation der Signalübertragungswege, ein besseres Verständnis über die Wirkung der therapeutisch eingesetzten Substanzen und einen Zugang zu einer molekular definierten Prognose von Erkrankungen. Außerdem ist das Expressionsprofil für die Krebsforschung^{20,26,97} von großer Bedeutung. Clusteranalysen von Expressionsprofilen aus einer Vielzahl von Tumorgeweben können Auskunft über den Verlauf der Erkrankung und über die Mechanismen der Therapieresistenz geben. Darüber hinaus können durch Mikroarrays bestimmte Mutationen wie Polymorphismen, die auf singulären Basenaustauschen beruhen (sog. „*single nucleotide polymorphisms*“ oder SNPs) für eine Reihe von Genen detektiert werden^{22,27,37}. Solche Mutationen können in der Antibiotika-Resistenz von pathogenen Mikroorganismen oder im abnormalen Stoffwechsel von Medikamenten in Menschen eine Rolle spielen.

1.3 Methoden der SNP-Detektion mittels DNS-Mikroarrays

Einige Methoden stehen für die SNP-Detektion im Mikroarray-Format zur Verfügung. Beispiele dafür sind *allele-specific oligonucleotide probe hybridisation* (ASOH)⁹³, *allele-specific single base extension* (ASSE)⁶⁷, *allele-specific primer extension* (ASPE)² und *allele-specific oligonucleotide probe ligation* (ASOL)³⁶. In Abbildung 1.11 sind die oben genannten vier Methoden schematisch dargestellt. Alle diese Methoden benötigen für jedes SNP mindestens zwei Sonden, die sich nur an der SNP-Position voneinander unterscheiden. Je nachdem ob an dieser Position eine perfekte Basenpaarung vorliegt oder nicht, wird sie *perfect match* (PM) oder *mismatch* (MM) -Sonde genannt.

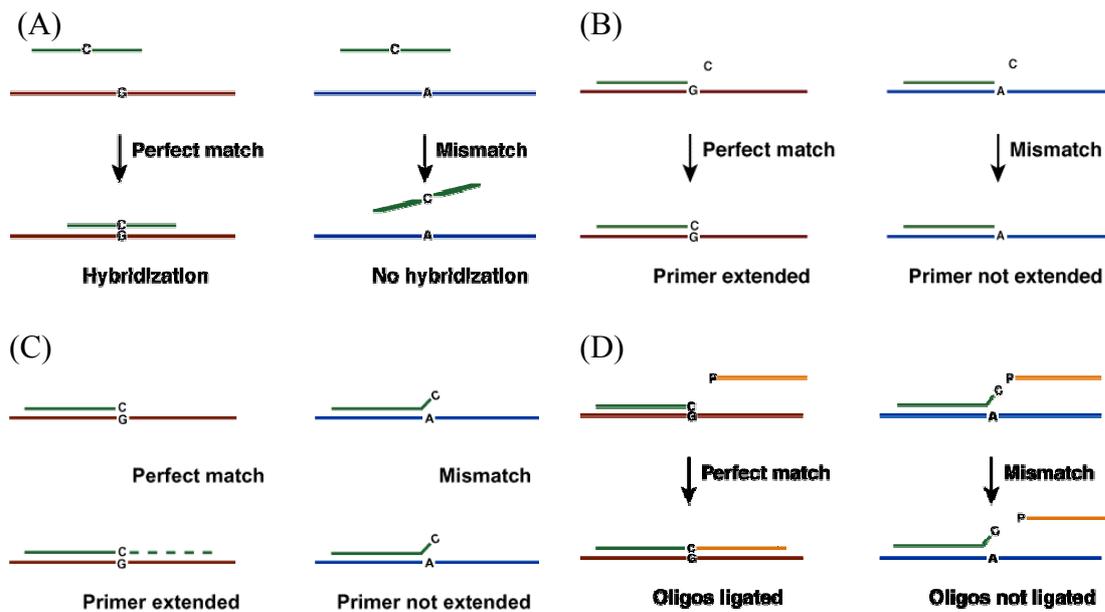


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der verschiedenen Methoden der SNP-Detektion⁴⁷. (A) *allele-specific oligonucleotide probe hybridisation*; (B) *allele-specific single base extension*; (C) *allele-specific primer extension*; (D) *allele-specific oligonucleotide probe ligation*

Bei ASOH soll die SNP-Position möglichst in der Mitte der Sonden liegen, während bei den anderen drei Methoden die SNP-Position am 3' Ende oder eine Base nach dem 3' Ende der Sonde liegt. Die Diskriminierung zwischen dem PM und dem MM wird allein durch Einstellung der Hybridisierungsbedingungen erreicht. Unter optimalen Bedingungen wird nur die PM-Sonde mit der Ziel-DNS hybridisieren, die MM-Sonde hingegen nicht. Die Destabilisierung einer Hybridstruktur durch ein MM einer einzelnen Base ist ausreichend, um die Hybridisierung der MM-Sonde zu verhindern. Weil kein Enzym hierbei verwendet wird, ist sie die einfachste und am weitesten verbreitete Methode zur SNP-Detektion. Der Nachteil dabei ist, dass eine einheitliche Hybridisierungsbedingung eingesetzt werden muss⁸². Im Fall der SNP-Detektion in großem Umfang ist es unwahrscheinlich, dass diese Bedingung für alle Sonden optimal ist.

Im Gegensatz zu ASOH benutzen die anderen drei Methoden eine enzymatische Reaktion zur SNP-Diskriminierung. Die Polymerase kann nur das Nucleotid polymerisieren, das komplementär zur Ziel-DNS ist. Die Ligase verbindet nur zwei perfekt komplementär an die Ziel-DNS gebundene Stränge. Diese Eigenschaften werden dazu genutzt, um ein PM von einem MM zu unterscheiden. Damit kann eine bessere Diskriminierung erzielt werden⁸⁸. Bei ASSE werden sowohl die PM-Sonde als auch die MM-Sonde an die Ziel-DNS hybridisiert. Der Unterschied liegt in der letzten Basenpaarung, die bei dem PM perfekt komplementär vorliegt, und bei dem MM nicht. Im nächsten Schritt werden jeweils markierte ddATP, ddTTP, ddGTP oder ddCTP in einer von vier Reaktionen zugegeben. Nur die perfekt komplementäre Sonde, einschließlich der letzten Base, wird um ein Nucleotid verlängert und somit der Fluoreszenzfarbstoff kovalent eingebaut. Die Detektion erfolgt durch ein sequenzielles Scannen der vier Arrays. Für diese Methode gibt es ein anderes Format. Dafür werden vier Fluoreszenzfarbstoffe, aber nur eine Reaktion benötigt. Weil in diesem Format die SNP-Position eine Base nach dem 3' Ende von Sonde liegt, wird für jede SNP-Position nur eine Sonde benötigt. Nach der Hybridisierung werden ddNTPs, die jeweils mit

verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, in einer Reaktion zugegeben. Nach dem gleichzeitigen Scannen dieses Arrays in einem Vierkanal-Scanner wird ermittelt, welche Base an der SNP-Position liegt. Dieses Format von ASSE wird auch *minisequencing*^{28,67} oder *genetic bit analysis*⁶³ genannt.

Das Funktionsprinzip von ASPE ähnelt dem ersten Format von ASSE. Der einzige Unterschied ist, dass dNTPs statt ddNTPs benutzt werden, wobei einer davon mit Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die PM-Sonde wird um mehr als eine Base verlängert, je nach der Länge der Ziel-DNS und der Zeit der Primer-Extension. Dadurch wird auch mehr als ein Fluoreszenzfarbstoff pro Sonde eingebaut. Dies führt zu einer höheren Sensitivität. Für ASOL wird neben der SNP enthaltenden Sonde noch eine andere Sonde zu der Reaktion zugegeben. Die SNP enthaltende Sonde ist auf dem Array immobilisiert. Die zusätzliche Sonde ist komplementär zur benachbarten Sequenz der Ziel-DNS auf der gegenüberliegenden Seite der SNP-Position. Diese Sonde ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nur die perfekt komplementäre PM-Sonde kann mit Hilfe einer Ligase mit der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sonde kovalent verbunden werden.

Zusätzlich zu den oben genannten Methoden sind auch andere Methoden zur SNP-Detektion verfügbar, wie z.B. *invasive cleavage* von Oligonukleotid-Sonden, Massenspektroskopie und Fluoreszenz-Polarisation. Alle diese Methoden haben das Potential, mit der Mikroarray-Technologie zu kombinieren.

1.4 Zielsetzung

Ein ernsthaftes Problem der Antibiotika-Therapie in der Humanmedizin ist die zunehmende Resistenzbildung der klinisch relevanten Stämme, die das eingenommene Antibiotikum unwirksam macht. Durch den Kontakt mit diesem Antibiotikum können Bakterien neue Resistenzen entwickeln, die eine höhere MHK verursachen und daher zum echten therapeutischen Problem führen. Die Verwendung des richtigen Antibiotikums bzw. der angemessenen Dosis ist notwendig für die Behandlung des Patienten. Daher ist eine schnelle Diagnose der Antibiotika-Resistenz unerlässlich. Die klassischen phänotypischen Methoden für die Resistenz-Diagnose und Taxonomie-Bestimmung benötigen mehr als einen Tag. Die Antibiotika-Therapie wird meist eingesetzt, bevor das Laborergebnis bekannt ist.

Als Breitband-Antibiotika stehen in erster Linie Chinolone zur Verfügung. Deshalb ist die Entwicklung eines schnellen diagnostischen Tests zur Detektion von Chinolon-Resistenzen in der Klinik von großer Bedeutung. Die modernen genotypischen Methoden bieten eine solche Möglichkeit. Vor allem ist die in den letzten zehn Jahren entwickelte Mikroarray-Technologie wegen ihrer Multiplexkapazität und ihrem hohen Durchsatz besonders geeignet für die Anwendung in der Kliniken. Obwohl vor kurzem bereits ein System zur Detektion von Chinolon-resistenten *Neisseria gonorrhoeae*¹⁴ unter der Verwendung von Mikroarrays entwickelt wurde, gibt es laut unserer Kenntnis keinen solchen Test für *E. coli*, eine der relevantesten Spezies für die Chinolon-Resistenz. Die Aufgabe dieser Arbeit ist, diese Lücke zu schließen.

Ein diagnostischer DNS-Mikroarray zur Genotypisierung der Chinolon-Resistenz in *E. coli* soll dabei entworfen und validiert werden. Zur Identifizierung der Resistenz verursachenden Mutationen, werden entsprechende Sonden benötigt. Für den Entwurf der Sonden sollte zuerst eine Sequenzanalyse durchgeführt werden, die sowohl auf der Information aus öffentlichen Datenbanken als auch auf den eigenen Sequenzierungsergebnissen basiert. Die Qualität der entwickelten Sonden sollte mit

Hilfe von klinischen Stämmen überprüft werden. Darüber hinaus soll das System für die Anwendung in der Klinik optimiert werden, hinsichtlich hoher Sensitivität, hoher Spezifität, kurzer Testzeit, einfacher Handhabung und niedriger Kosten. Zum Schluss sollte das optimierte Verfahren unter klinischen Bedingungen evaluiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bioreagenzien

Herstellerfirma	Produkt
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)	FluoroLink Cy3-dCTP, Cy5-dCTP
Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	Big-dye Terminator Cycle Sequencing Kit
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	<i>Taq</i> DNS-Polymerase
Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein, Deutschland)	1Kb Dann Ladder, 1Kb Plus DNS Ladder
Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	dNTPs
Promega (Mannheim, Deutschland)	RQ1 RNase-free DNase Kit
Qiagen (Hilden, Deutschland)	QIAquick PCR Purification Kit
Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)	GenElute™ PCR Clean-up Kit

2.1.2 Chemikalien

Herstellerfirma	Produkt
Fluka Chemie (Buchs, Schweiz)	Borsäure, Bromphenolblau, DMSO, EDTA, Ethidiumbromid, Ethylenglykol, Formamid, Harmstoff, HCl, KCl, NaCl, Na ₂ EDTA · H ₂ O, NaH ₂ PO ₄ , NaOH, Natriumacetat, SDS, TEMED, Triton X-100
Gibco BRL Life Technologies Technologies (Eggenstein, Deutschland)	Agarose,
Merck (Darmstadt, Deutschland)	LiChrosolv® Wasser für die Chromatographie (HPLC Wasser)
Riedel-de-Haen (Seelze, Deutschland)	Ethanol (absolut und 95%), Essigsäure, Glycerin, Tris
Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Rotiphorese®-NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40% (19:1), Rotiphorese®-NF 10 x TBE Buffer,
Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)	1-Methyl-2-Pyrrolidinon (wasserfrei), APS, Bernsteinsäureanhydrid, Natriumcitrat·2H ₂ O

2.1.3 Geräte

Herstellerfirma	Geräte	Bezeichnung/Type
Affymetrix (Santa Clara, USA)	Array-Scanner	418 Array Scanner
Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)	DNS-Sequenzierer	ABI Prism 377 [®] -DNS-Sequencer
Biometra (Göttingen, Deutschland)	Hybridisierungssofen UV-Crosslinker	OV5 Hybridisierungssofen Stratalinker [®] UV Crosslinker 1800
Biorobotics (Cambridge, England)	Spotter	Microgrid II Microarrayer
Corning (New York, USA)	Hybridisierungskammer	Corning [®] Hybridization Chamber
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	Zentrifuge Heizblock PCR Cycler Pipetter Vakuum-Konzentrator Slide-Schüttler	5417R, 5810R und MiniSpin [®] Wechselblock Slides MasterCycler [®] Gradient, Research, Research Pro Concentrator 5301 Thermomixer Comfort
Fujifilm (Düsseldorf, Deutschland)	Gel Dokumentation System	Image Reader Las-1000 Plus
Memmert (Schwabach, Deutschland)	Trockenschrank	Universal Ofen (Model U)
NanoDrop Technologies	Spektrophotometer	ND-1000 Spectrophotometer
Scientific Industries (New York, USA)	Vortex	Vortex-Genie 2 TM
Tecan (Crailsheim, Deutschland)	Hybridisierungsstation	HS 400 Hybridisation Station
WTW (Weiheim, Deutschland)	PH-Meter	pH500

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Herstellerfirma	Produkt
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	CreativeChip [®] Oligo Slides, In Situ Frame (25 µl und 65 µl), Reaktionsgefäße
Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)	384 Well Polystyrol(PS)-Miroplatten (U-Form), Pipettenspitzen
Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	Oligonukleotid-Sonden für <i>gyrA</i> -Array (entsalzt), PCR Primers (entsalzt)
Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland)	Oligonukleotid-Sonden für <i>parC</i> -Array oder Oligonukleotid-Sonden mit 5' Ende Cy3/Cy5 Modifikation (kontrolliert mit MALDI TOF)
Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)	Oligonukleotid-Sonden mit Inosin (entsalzt), poly-L-lysin (PLL) Objektträger

2.1.4 Klinische Stämme

Bezeichnung	Nummer	Krankenhaus	Material	Antibiotika	Phenotype
<i>E. coli</i> 1	481579	Robert-Bosch	Vaginalabstrich	Cipro, Levo	sensitive
<i>E. coli</i> 2	428386	Robert-Bosch	Abstrich-Abszeß	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 3	428386	Robert-Bosch	Abstrich-Abszeß	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 4	429817	Robert-Bosch	Abstrich-Unterschenkel	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 5	441888	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 6	450042	Robert-Bosch	Abstrich-Rachen	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 7	427583	Winnenden	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 8	427799	Winnenden	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 9	447694	Robert-Bosch	Bronchialsekret	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 10	608146	Backnang	Mittelstrahlurin	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 11	610229	Schorndorf	Mittelstrahlurin	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 12	450542	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 13	450548	Robert-Bosch	Abstrich-Rachen	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 14	456478	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 15	459184	Robert-Bosch	Kathetrurin	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 16	459343	Robert-Bosch	Kathetrurin	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 17	459450	Robert-Bosch	Trachealsekret	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 18	459581	Robert-Bosch	Leistenabstrich	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 19	471435	Robert-Bosch	Blutkultur peripher	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 20	428386	Robert-Bosch	Abstrich-Abszeß	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 21	456275	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 22	465629	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 23	450562	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 24	456495	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 25	400547	Robert-Bosch	Kathetrurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 26	428195	Robert-Bosch	intraoperativer Abstrich	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 37	453324	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 28	452141	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 29	453276	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 30	453339	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 31	450317	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro	resistent
<i>E. coli</i> 32	484994	Robert-Bosch	Mittelstrahlurin	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 33	484883	Robert-Bosch	Kathetrurin	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 34	484790	Robert-Bosch	Kathetrurin	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 35	482748	Winnenden	Mittelstrahlurin	Cipro, Levo	resistent
<i>E. coli</i> 36	484589	Robert-Bosch	Kathetrurin	Cipro, Levo	resistent

2.1.5 Software

Herstellerfirma / Webseite	Produkt
Biodiscovery (Los Angeles, USA)	ImaGene™ (Version 3.0)
DNASStar (Madison, USA)	SeqMan™ II (Version 5.00)
Molecular Biology Insights (Cascade, USA)	Oligo (Version 6.65)
PREMIER Biosoft International (Palo Alto, Kanada)	Array Designer (Version 2.00)
Kostenlose Software ⁸⁷ ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/	ClustalX (Version 1.81)
Kostenlose Software ⁴ (am NCBI Server)	Nukleotide - Nukleotide BLAST (blastn)

2.1.6 Werkzeuge zur Programmierung

Webseite für Downloads	Typ	Werkzeug
Implementiert durch Browser	Sprache für Webseite	HTML (Version 4.0.1)
http://www.activestate.com/Products/ActivePerl/	Programmiersprache	PERL für Linux (Version 5.8.0)
http://ftp.leo.org/pub/comp/general/info/sys/www/daemons/apache/dist/httpd/	Webserver	Apache (Version 1.3)
http://dev.mysql.com/downloads/mysql/3.23.html	Datenbank Server	MySQL (Version 3.23.28-gamma)
Red Hat GmbH (Stuttgart, Deutschland)	Betriebssystem	RedHat (Version 8.0)
IDM Computer Solutions (Ohio, USA)	Text Editor	UltraEider-32 [®] (Version 8.20a+)

2.2 Lösungen

Blockierungslösung für PLL-Objektträger

0.18 M Bernsteinsäureanhydrid in methyl-pyrrolidinone
44 mM Natriumborat pH 8.0

Druck-Puffer für Epoxid-Objektträger

160 mM Na₂SO₄
130 mM Na₂HPO₄

Spüllösung 1 für Epoxid-Objektträger

0.1 % (v/v) Triton x 100 in ddH₂O

Spüllösung 2 für Epoxid-Objektträger

0.5 µl konzentriert HCl per ml ddH₂O

Spüllösung 3 für Epoxid-Objektträger

100 mM KCl

Blockierungslösung für Epoxid-Objektträger

25 % (v/v) Ethylenglykol
0.5 µl konz. HCl per ml ddH₂O

20 X SSPE

175.3 g NaCl
88.2 g NaH₂PO₄·1H₂O
7.4 g Na₂EDTA
800 ml H₂O
10 M NaOH (PH 7.4)
ad 1l ddH₂O

20 X SSC

175.3 NaCl
88.2 g Na₃Citrat·2H₂O

HCl (PH 7.0)
ad 1l ddH₂O

Waschlösung I für PLL-Objektträger
2 X SSC
0.1% SDS

Waschlösung II für PLL-Objektträger
0.2 X SSC

Waschlösung 1 für Epoxid-Objektträger
2 X SSC
0.2% SDS

Waschlösung 2 für Epoxid-Objektträger
2 X SSC

Waschlösung 3 für Epoxid-Objektträger
0.2 X SSC

2.3 Methoden

2.3.1 DNS Isolierung und phänotypische Bestimmung

Die genomische DNS wurde vom Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie (IKP) am Robert-Bosch-Krankenhaus (RBK) zur Verfügung gestellt. Alle DNS-Proben waren aus reinen Kulturen von klinischen Stämmen mittels *QIAamp DNA Mini Kit* nach Protokoll des Herstellers isoliert, ausgenommen von Aufstock-Versuchen. Beim Aufstock-Versuch wurde DNS aus Urin isoliert, die mit Chinolon-resistenten *E. coli* Stämmen in verschiedenen Verdünnungsreihen (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 CFU/ml) versetzt war. Die klinischen Stämme (siehe 2.1.4) stammten von Patientenmaterial aus klinischer Routinearbeit der 4 Krankenhäuser und wurden von 1 bis 36 durchnummeriert.

Die Resistenzbestimmung gegen Chinolone erfolgte nach der NCCLS (US-amerikanische Norm) Richtlinie unter Verwendung von Ciprofloxacin allein oder Ciprofloxacin und Levofloxacin.

2.3.2 DNS Sequenzierung

Das *gyrA*-Fragment in der Länge von 418-bp und das *parC*-Fragment in der Länge von 595-bp, welche die QRDR (*Quinolone resistance determining region*) beinhaltet, wurden mittels der entsprechenden Primer amplifiziert (Tabelle 2.1). Für die Amplifikation des *gyrA*-Fragments wurden Primer GyrA_coli_F1 und GyrA_coli_R1 verwendet, Primerpaar ParC_coli_F2 und ParC_coli_R2 für Amplifikation des *parC*-Fragments. Der Reaktionsansatz für die PCR wurde gemäß Tabelle 2.2 vorbereitet. Die anschließende PCR erfolgte im *Thermocycler MasterCycler[®] Gradient* von Eppendorf unter Verwendung des Programms in Tabelle 2.3. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde für die Sequenzierungs-PCR zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.1: Primer für die PCR und die Sequenzierung

Name	Verwendung	Sequenz (5' → 3')
GyrA_coli_F1	Vorwärtsprimer für 418-bp <i>gyrA</i> -Fragment	CCATACCTACGGCGATAACCG
GyrA_coli_R1	Rückwärtsprimer für 418-bp <i>gyrA</i> -Fragment	GCCTGAAGCCGGTACACCGT
GyrA_coli_F3	Vorwärtsprimer für 189-bp <i>gyrA</i> -Fragment	ACGTACTAGGCAATGACTGG
GyrA_coli_R3	Rückwärtsprimer für 189-bp <i>gyrA</i> -Fragment	AGAGTCGCCGTCGATGGAAC
ParC_coli_F1	Vorwärtsprimer für 264-bp <i>parC</i> -Fragment	TGTATGCGATGTCTGAACTG
ParC_coli_R1	Vorwärtsprimer für 264-bp <i>parC</i> -Fragment	CTCAATAGCAGCTCGGAATA
ParC_coli_F2	Vorwärtsprimer für 595-bp <i>parC</i> -Fragment	AATGAGCGATATGGCAGAGC
ParC_coli_R2	Vorwärtsprimer für 595-bp <i>parC</i> -Fragment	CTGGTCGATTAATGCGATTG

Tabelle 2.2: PCR Ansatz

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Vorwärtsprimer (20 µM)	1 µl	0.4 pM
Rückwärtsprimer (20 µM)	1 µl	0.4 pM
10 x <i>Taq</i> Buffer*	5 µl	1 x
dNTP-Mix (je 2.5 mM)	5 µl	0.25 mM
Template**	-	~ 100 ng / 50 µl
<i>Taq</i> polymerase (5 U/µl)	0.5 µl	2.5 U / 50 µl
HPLC H ₂ O	ad 50 µl	-

* enthält 15 mM Mg(OAc)₂** genomische DNS des *E. coli* Stammes**Tabelle 2.3:** Programm für die PCR

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
1	94°C, 5min	55°C, 1min	72°C, 1min	1
2	94°C, 1min	55°C, 1min	72°C, 1min	28
3	94°C, 1min	55°C, 1min	72°C, 10min	1

Für die Sequenzierung von *gyrA*- und *parC*-Fragmenten wurde dasselbe Primerpaar verwendet. Der Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR wurde gemäß dem Schema in Tabelle 2.4 mit dem *big-dye terminator cycle sequencing kit* angesetzt.

Dieses Kit enthielt die AmpliTaq® DNS Polymerase, dNTPs, sowie die unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Die Sequenzierungs-PCR erfolgte im Thermocycler unter den in Tabelle 2.5 angegebenen Bedingungen. Die Sequenzierung wurden von Jutta Secker (Institut für Technische Biochemie) mit dem ABI Prism™ 377A-DNS-sequencer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit SeqMan™ II Software.

Tabelle 2.4: Ansatz für die Sequenzierungs-PCR

Komponente	Menge
<i>big-dye terminator cycle sequencing reaktion mix</i>	4 µl
Sequenzier-Primer (3.2 µM)	1 µl
DNS	~ 200 ng
HPLC H ₂ O	ad 20 µl

Tabelle 2.5: Programm für die Sequenzierungs-PCR

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
1	94°C, 1 min	-	-	1
2	94°C, 40 sec	55°C, 40 sec	60°C, 4 min	25
3	-	-	60°C, 4 min	1

2.3.3 Sondendesign

Die Oligonukleotid-Sonden für die Detektion von wichtigen Resistenzen, die durch Mutationen in *gyrA*- und *parC*-Gene verursacht werden, wurde anhand der Sequenzanalyse in der Sequenzdatenbank GenBank und der Literaturanalyse in der Literaturdatenbank PubMed sowie eigener Sequenzierungsdaten von klinischen Stämmen entworfen. Für jede SNP-Position wurden vier Sonden benötigt, die sich nur um eine einzige Base voneinander unterscheiden. Diese variierende Base lag bei der allelspezifischen Hybridisierungs- Sonde (*allele specific hybridisation*) in der Mitte der Sondesequenz und bei der allelspezifischen *Primerextension*-Sonde (*allele specific primer extension*) am 3' Ende der Sondesequenz. Alle Sonden haben eine Länge von 19 Nukleotiden. Die *allele specific primer extension* Sonden enthalten zusätzlich einen 14-Thymidin Abstandhalter (Spacer) und eine Aminomodifikation am 5' Ende. Die potentielle Bildung von Sekundärstrukturen der Sonden wurde mit der Software Array Designer überprüft. Für die Qualitätskontrolle in jedem Schritt des Mikroarray-Experimentes wurden vier Kontroll-Sonden ebenfalls entworfen (Tabelle 2.6). Die Sequenzen der Kontroll-Sonden für Drucken, Hybridisierung und negative Hybridisierung wurden aus dem *Arabidopsis* Genom ausgewählt und die Möglichkeit der Kreuzhybridisierung mit *E. coli* DNS wurde ausgeschlossen. Die Prozesskontroll-Sonden für *gyrA*- und *parC* stellen eine Konsensessequenz von *E. coli gyrA* bzw. *parC* dar.

Tabelle 2.6: Sonden für Qualitätskontrolle

Name	Funktion	Sequenz (5' → 3')
SK	Druck-Kontrolle	Cy3/Cy5-TCTAGACAGCCACTCATA
HK*	Hybridisierungs-Kontrolle	GATTGGACGAGTCAGGAGC
NHK	negative Hybridisierungs-Kontrolle	TCTAGACAGCCACTCATA
<i>gyrA</i> -PK	<i>gyrA</i> Prozesskontrolle	TAATCGGTAATAACCATCC
<i>parC</i> -PK**	<i>parC</i> Prozesskontrolle	TATTTACCCAGTACGTCACC

* Oligonukleotide, die eine komplementäre Sequenz besitzt und mit Cy3 oder Cy5 markiert ist, wird in der Hybridisierung zugegeben.

** besitzt am 5' Ende ein 14-Thymidin Abstandhalter und eine Aminomodifikation.

2.3.3.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Um die *gyrA** und *parC** Sequenzen zu erhalten, wurde eine Homologiesuche mittels BLAST jeweils mit einer *gyrA*- und *parC*-Sequenz von *E. coli* als Template in der GenBank durchgeführt. Die Ausgabe-Datei von BLAST wurde mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Perlskript für Multisequenz-Alignment vorbereitet. Das Perlskript extrahiert nur die *E. coli* Sequenzen mit einer Minimumlänge von 120 bp und schreibt diese Sequenzen wiederum in eine Textdatei um, als Eingabe-Datei für das Multisequenz-Alignment-Programm ClustalX.

* Alle in dieser Dissertation erwähnten *gyrA* und *parC* Sequenzen beziehen sich auf *E. coli*.

2.3.3.2 Clustalx

Um die SNP-Positionen zu identifizieren, wurde ein Multisequenz-Alignment mittels Clustalx durchgeführt. Die aus der Homologiesuche gewonnenen Sequenzen wurden mit den Sequenzen, die aus der Sequenzierung von klinischen Isolaten stammten, abgeglichen, dadurch wurden die SNP-Positionen hervorgehoben und für das Sondendesign identifiziert.

2.3.3.3 Interne Datenbank mit Annotation von Mutationen

Um mehr Informationen über Resistenz-relevante Mutationen zu bekommen, wurde eine Literatursuche in PubMed durchgeführt. Die hierbei gefundenen Mutationen wurden mit der zugehörigen Publikation in einer lokalen Datenbank gespeichert. Mit Hilfe dieser Daten wurden die wichtigsten Mutationen dem entsprechenden Nukleotidaustausch zugeordnet und für das Sondendesign zur Verfügung gestellt.

2.3.4 Vorbereitung der Ziel-DNS

2.3.4.1 Amplifikation der Ziel-DNS

Das 289-bp *gyrA*-Fragment und das 264-bp *parC*-Fragment, welches die QRDR beinhaltet und innerhalb des sequenzierten Bereiches liegt, wurde mittels der entsprechenden Primer (Tabelle 2.1) amplifiziert und als Ziel-DNS für das Microarray-

Experiment verwendet. Zur Amplifikation des *parC*-Fragments wurden die Primer GyrA_coli_F3 und GyrA_coli_R3 verwendet, und Primerpaar ParC_coli_F1 und ParC_coli_R1 zur Amplifikation des *parC*-Fragments. Die Zusammensetzung des Ansatzes und die PCR-Bedingungen stimmten mit den Angaben in Tabelle 2.2 und 2.3 überein und wurden auch hier für die Amplifikation von unmarkiertem *parC*-Fragment zur allelspezifischen *Primerextension* verwendet. Die Amplifikation von markiertem *gyrA*- und *parC*-Fragment wurde durch Zugabe von Cy5- oder Cy3-modifiziertem dCTP im PCR Ansatz erreicht. Parameter, die Einfluß auf die Ausbeute von PCR-Produkt und Einbaurrate des Fluoreszenzfarbstoffs haben können, wurden für die Optimierung der *gyrA*-Markierungs-PCR untersucht. Verschiedene Bedingungen für diese Parameter wurden systematisch untersucht (Tabelle 2.7). Die optimierten Bedingungen (Tabelle 2.8 und 2.9) wurden dann für die Evaluierung des Array verwendet. Mit Ausnahme des Mischung-Experimentes und dem Aufstock-Versuch wurde für jede PCR 100 ng genomische DNS eines Stammes eingesetzt. Im Mischungs-Experiment wurden 140 ng genomische DNS von einem sensitiven *E. coli* Stamm mit unterschiedlichem Anteil (1:0, 100:1, 10:, 1:1 und 0:1) von genomischer DNS von einem resistenten *E. coli* Stamm vermischt und als Template für die PCR verwendet. Um die Sensitivität des Systems zu testen, wurde in dem Aufstock-Versuch 10000, 1000, 100, 10 and 1 CFU jeweils für die PCR eingesetzt.

Tabelle 2.7: Untersuchte Parameter für die Optimierung der Markierungs-PCR

Parameter	Bedingung
Annealing-Temperatur,	50, 55 und 60°C
Zyklenzahl	20, 30 und 40
Mg ²⁺ Konzentration	1.5, 3.0 und 4.5 mM
Verhältnis zwischen unmarkiertem und markiertem dCTP	2:1, 3:2, 1:1 und 2:3
Typ des Fluoreszenzfarbstoffs	Cy3 und Cy5
<i>Taq</i> Polymerase Einheiten	2.5, 5 und 10 U

Tabelle 2.8: Optimierter Ansatz für Markierungs-PCR

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Vorwärtsprimer (20 μM)	1 μl	0.4 pM
Rückwärtsprimer (20 μM)	1 μl	0.4 pM
10 x <i>Taq</i> Buffer*	5 μl	1 x
dNTP-Mix ohne dCTP (je 2.5 mM)	2	0.1 mM
dCTP (1 mM)	1.2 μl	0.06 mM
Cy3-dCTP	2 μl	0.04 mM
Template**	-	~ 100 ng / 50 μl
<i>Taq</i> polymerase (5 U/ μl)	2 μl	10 U / 50 μl
HPLC H ₂ O	ad 50 μl	-

* Oligonukleotide, die eine komplementäre Sequenz besitzt und mit Cy3 oder Cy5 markiert ist, wird in der Hybridisierung zugegeben.

** besitzt am 5' Ende ein 14-Thymidin Abstandhalter und eine Aminomodifikation.

Tabelle 2.9: Optimiertes Programm für die PCR

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen
1	94°C, 5min	55°C, 1min	72°C, 1min	1
2	94°C, 1min	55°C, 1min	72°C, 1min	38
3	94°C, 1min	55°C, 1min	72°C, 10min	1

2.3.4.2 Aufreinigung des PCR-Produkts

PCR-Produkt aus der Markierungs-PCR und aus der PCR ohne Markierung wurde mittels *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.3.4.3 Bestimmung von DNS-Konzentration und Einbaurrate des Fluoreszenzfarbstoffes

Die Konzentration der DNS und des Fluoreszenzfarbstoffs eines aufgereinigten PCR-Produkts wurde durch das *NanoDrop* Spektrophotometer gemessen. Das Absorptionsmaximum der DNS liegt bei 260 nm und das Absorptionsmaximum von Cy3 bzw. Cy5 liegt bei 550 nm bzw. 650 nm. Dafür wurde 1 μl DNS benötigt. Die Einbaurrate wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$R = \frac{\frac{C_{DNA}}{M_A} \times 1000}{C_F}$$

R: Einbaurrate von Cy3 oder Cy5 in NT/Cy3 oder NT/Cy5

C_{DNS} : DNS Konzentration in ng/ μl

C_F : Cy3 oder Cy5 Konzentration in pmol/ μl

M_A : Durchschnittliches Molargewicht eines Nukleotids in g/mol

2.3.4.4 Fragmentierung von Ziel-DNS

Für die Fragmentierung wurden 30 ng/ μ l Ziel-DNS für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit DNase in Reaktionspuffer (40mM Tris-HCl, (pH 8), 10 mM MgSO₄ und 1 mM CaCl₂) inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zugabe von 3 mM EGTA und dann 10 Minuten Inkubation bei 65°C.

2.3.5 Arrayherstellung

2.3.5.1 Poly-L-Lysin-Objektträger

Die Oligonukleotid-Sonden wurden in 50% DMSO in einer Konzentration von 20 μ M gelöst und entsprechend dem Mikroarray-Layout in die Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten und U-förmigem Boden pipettiert. Die Sonden wurden dann mittels einem *Microgrid II microarrayer* dem Layout nach mit 54% Luftfeuchtigkeit auf Poly-L-Lysin-Objektträger (PLL-Objektträger) in zwei Subarrays gedruckt. Die Immobilisierung der Sonden erfolgte durch UV-Bestrahlung mit einer Energie von 120 mJ/m² im Stratalinker. Anschließend wurden die unbesetzten Bindungsstellen mit Blockierlösung durch 15-minütiges Rühren gesättigt. Danach wurden die Objektträger jeweils mit ddH₂O und 98%-igem Ethanol kurz gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Mikroarrays waren dann einsatzbereit und wurden für die weiteren Versuche im Dunkeln gelagert.

2.3.5.2 Epoxid-Objektträger

Die Sondenlösung für Epoxid-Objektträger enthielt 1x Druck-Puffer und 20 μ M Oligonukleotid-Sonden. Die Sonden wurden mittels *Microgrid II microarrayer* in Triplikaten gedruckt. Der Abstand zwischen den Spots betrug 0.35 mm und der Durchmesser der Spots etwa 140 μ m. Die Immobilisierung der Sonden erfolgte durch 30-minütiges Backen im Trockenschrank bei 60°C für die Objektträger mit aminomodifizierten Sonden, bzw. 120°C für die Objektträger mit nicht-aminomodifizierten Sonden. Die nicht kovalent gebundenen Sonden wurden dann durch jeweils 5, 4, 10 und 1minütige gerührte Inkubation in Spüllösung 1, Spüllösung 2, Spüllösung 3 und ddH₂O abgewaschen. Anschließend wurden die Objektträger mit Blockierlösung im OV5 Hybridisierungssofen bei 50°C durch leichtes Schütteln behandelt, um die restlichen freien Bindungsstellen zu besetzen. Danach wurden die Objektträger mit ddH₂O eine Minuten gewaschen und dann mit Stickstoff getrocknet.

2.3.6 Hybridisierung

Die Hybridisierungslösung bestand aus 6x SSPE, geeigneter Menge an Ziel-DNS und 0.1 pmol Cy3 oder Cy5 markiertem Oligonukleotid, das komplementär zu der Hybridisierungs-Kontrolle-Sonde war. Für die Hybridisierung auf PLL-Objektträger bzw. auf Epoxid-Objektträger wurden jeweils 4 pmol bzw. 1 pmol DNS verwendet, wenn nicht anders erwähnt.

2.3.6.1 Hybridisierung im Hybridisierungssofen

30 µl Hybridisierungslösung wurde auf die mit Sonden bedruckte Oberfläche des Objektträgers aufgetragen und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) oder mit *In Situ Frame* (25 µl) luftblasenfrei abgedeckt. Dann wurde der Objektträger in eine Hybridisierungskammer, dessen Feuchtigkeitsreserve mit jeweils 20 µl ddH₂O gefüllt war, verschlossen. Die Hybridisierung erfolgte bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur in einem Hybridisierungssofen. Die Hybridisierungszeit für PLL-Objektträger bzw. Epoxid-Objektträger betrug jeweils drei Stunden bzw. eine Stunde, wenn nicht anders erwähnt. Um die nicht gebundene Ziel-DNS abzuwaschen, wurde der PLL-Objektträger nach der Hybridisierung 15 Minuten in Waschlösung I und dann drei Minuten in Waschlösung II unter Rühren gewaschen. Die Behandlung von Epoxid-Objektträgern erfolgte durch 10-minütiges Rühren jeweils in Waschlösung 1, Waschlösung 2 und Waschlösung 3. Anschließend wurde der Objektträger mit Stickstoff getrocknet.

2.3.6.2 Hybridisierung im Thermomixer

70 µl Hybridisierungslösung wurde auf den Epoxid-Objektträger aufgetragen und mit einem *In Situ Frame* (65 µl) abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte bei 45°C in *Thermomixer comfort* mit austauschbarem *Thermoblock* für Objektträger (nachfolgend bezeichnet als *Thermomixer*). Die Hybridisierungszeit betrug eine Stunde, abgesehen vom Sensitivitätstest. Der Waschschrift war entsprechend dem oben beschriebenen.

2.3.6.3 Hybridisierung in der Tecan HS400

70 µl Hybridisierungslösung wurde für die Hybridisierung in der *HS 400 Hybridisierungsstation* von Tecan (nachfolgend bezeichnet als Tecan) verwendet. Die Hybridisierung dauerte eine Stunde bei 45°C mit mittlerer Agitationsfrequenz (Periode von 1.5 min Agitation und 7 min Pause). Das Waschen erfolgte bei 23°C in zwei Schritten: jeweils zwei Läufe mit Waschlösung 1 (1.5 min Waschen / 0.5 min Pause) und Waschlösung 3 (1.5 min Waschen / 0.5 min Pause). Dann wurde der Objektträger im Stickstofffluss zwei Minuten bei 30°C getrocknet.

2.3.7 Primer Extension

Für die *Primer Extension* Reaktion wurde 70 µl Reaktionsansatz auf die Objektträger, die bereits mit nicht markierter Ziel-DNS mittels Tecan hybridisiert und gewaschen wurden, aufgetragen und mit *In Situ Frames* (65 µl) luftblasenfrei abgedeckt. Die Reaktion fand bei 45°C statt. Nach der Reaktion wurde der Objektträger zwei Minuten mit 0.2 x SSC gewaschen und dann mit Stickstoff getrocknet. Verschiedene Parameter wurden für die Optimierung systematisch untersucht (Tabelle 2.10). Die optimierten Bedingungen (Tabelle 2.11 und 2.12) wurden dann für die Evaluierung des Arrays verwendet.

Tabelle 2.10: Untersuchte Parameter für die Optimierung der Primer Extension Reaktion

Parameter	Bedingung
Annealing-Temperatur, Reaktionszeit	45, 55, 65 und 72°C 10, 30 und 60 min
dNTP*	0.1, 1 und 10 µM
<i>Taq</i> Polymerase Einheiten	2.5, 5 und 10 U

* enthält nicht markiert dATP, dTTP, dGTP und mit Cy3 markiertes dCTP

Tabelle 2.11: Optimierter Ansatz für Primer Extensions Reaktion

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 x <i>Taq</i> Buffer*	7 µl	1 x
dNTP-Mix (1 µM)	7 µl	0.1 µM
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	2 µl	10 U / 70 µl
HPLC H ₂ O	ad 70 µl	-

* enthält nicht markiert dATP, dTTP, dGTP und mit Cy3 markiertes dCTP

Tabelle 2.12: Optimiertes Programm für die Primer Extensions Reaktion

Temperatur	Reaktionszeit	Zyklen
72°C	30 min	1

2.3.8 Arrayauswertung

2.3.8.1 Detektion des Fluoreszenzsignals

Das Fluoreszenzsignal des hybridisierten Mikroarrays wurde mittels einem *GMS 418 Array Scanner* gemessen und als 16-bit TIF-Datei gespeichert. Dazu wurde grünes Laserlicht (532 nm) bzw. rotes Laserlicht (630 nm) für die Anregung von Cy3 bzw. Cy5 benutzt. Die Laserstärke und PMT (*photomultiplier tube*)-Verstärkung wurden auf 100% eingestellt.

2.3.8.2 Datenverarbeitung

Die Intensitäten der Spots wurden mit der *ImaGene* (BioDiscovery) Software ermittelt und die ausgegebene Text-Datei wurde in Excel importiert. Die Sondenintensität wurde folgendermaßen definiert: Der Mittelwert des lokalen Hintergrundes subtrahiert von dem Mittelwert des Signals. Für den PLL-Objektträger wurde der Mittelwert von der einzelnen Sondenintensität aus zwei Subarrays berechnet. Für den Epoxid-Objektträger wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der einzelnen Sondenintensität, die in Triplikaten gedruckt war, berechnet. In dem Versuch mit drei Array wurde der Mittelwert und die Standardabweichung aus dem einzelnen Array gebildet. Um die Fluoreszenzintensität zwischen verschiedenen Markierungs-PCRs vergleichen zu können, wurde in Mischungs-Experimenten zwei Methoden zur

Normierung benutzt. In der Methode 1 wurde die Sondenintensität von der Prozesskontrolle auf 1 eingesetzt und die Sondenintensität aller anderen Sonden auf diese Sonde bezogen. In der Methode 2 wurde die Fluoreszenzintensität von der Sonde, die auf den sensitiven *E. coli* gerichtet ist, als 100% definiert und die Sondenintensität aller anderen Sonden auf diese Sonde prozentual umgerechnet.

2.3.8.3 Automatisches Analyseprogramm

Für die automatisierte Datenverarbeitung wurde ein im Rahmen dieser Arbeit entwickeltes Hilfsprogramm eingesetzt.

2.3.9 Bioinformatik

2.3.9.1 Betriebssystem und Webbrowser

Als Betriebssystem wurden Microsoft Windows NT 4.0 und Redhat Linux 6.2 verwendet. Der Microsoft Internet Explorer oder Netscape Navigator wurden als Webbrowser benutzt. Die Webseiten wurden in HTML 4.0.1 geschrieben. HTML ist das Format, in dem die Text- und Hypertext-Informationen im WWW gespeichert und übertragen werden.

2.3.9.2 WWW Server

Für die CGI (Common Gateway Interface) -Anwendung, war der Apache HTTP Server Version 1.3 im Einsatz. CGI beschreibt den Vorgang, wie die vom Anwender am Webbrowser eingegebene Daten an den Webserver gesendet werden, und wie die Daten dort an ein CGI-Programm weitergeleitet werden. Die Kombination aus Apache, Perl und MySQL ist eine optimale Lösung für die Programmierung und den Betrieb dynamischer Webseiten.

2.3.9.3 Datenbankserver

Für die relationale Datenbank wurde MySQL 3.2 als Datenbankserver verwendet. MySQL ist ein Open-Source-Produkt und wurde von einer schwedischen Firma namens TcX entwickelt. Zur Bedienung der MySQL Datenbank auf der Windows-Oberfläche wurde die phpMyAdmin Version 2.0 verwendet. Es bietet eine graphische Benutzeroberfläche, mit der man leichter mit Datenbanken arbeiten kann, im Vergleich zur Kommandozeile-Bedienung. As Abfragesprache wurde SQL (*Structured Query Language*) benutzt. Sie wurde von der Firma IBM entwickelt und ist geeignet für das Verrichten der Arbeit innerhalb einer relationalen Datenbank.

2.3.9.4 Programmiersprachen

Perl (ActivePerl Distribution) 5.8 wurde als Programmiersprache eingesetzt. Perl (*Practical Extraction and Report Language*) wurde von Larry Wall entwickelt und geeignet sich für Auswertung komplexer Zeichenketten. Im Vergleich zur Programmiersprache C ist Perl leicht zu lernen, und vom System unabhängig, daher übertragbar auf verschiedene Systeme (fast jedes System hat eigenen Perl-Interpreter).

3 Ergebnisse

3.1 *gyrA*-Array

3.1.1 Sondendesign

Um die für das Sondendesign notwendige Sequenzinformation zu erhalten, wurde eine umfangreiche Sequenzanalyse in öffentlichen Datenbanken durchgeführt. Durch eine Homologiesuche in der Datenbank GenBank wurden 21 Sequenzen von *E. coli gyrA* ermittelt. Abbildung 3.1 zeigt einen Abschnitt des Sequenz-Alignments, der für das Sondendesign in Frage kommt. Es wurde eine *missense* Mutation an Position 87 in einer Sequenz (*accession* Nummer Y005455 in GenBank) und zwei stille Mutationen an Position 84 (*accession* Nummer AE005455 und AP002560 in GenBank) und 85 (*accession* Nummer AE005455, AP002560, AF52254, etc. in GenBank) in mehreren Sequenzen gefunden. Die *missense* Mutation verursacht einen Aminosäure-Austausch. Die stille Mutation verursacht keinen Aminosäure-Austausch.



Abbildung 3.1: Sequenz-Alignment von 21 *E. coli gyrA*-Sequenzen. (Gezeigt wird nur ein Ausschnitt aus der Sequenz um Position 83 und 87. Die nummerierten Pfeile zeigen die Positionen der Mutationen innerhalb dieser 21 Sequenzen.)

Um mehr Informationen zu erhalten, wurden auch die Publikationen von 1985 bis 2003 analysiert. Hierbei wurden insgesamt 13 Positionen gefunden (Abbildung 3.2 und Tabelle 3.1), die entweder *missense* Mutation oder stille Mutation besitzen. Um ein zuverlässiges Sondendesign für klinische Stämme zu gewährleisten, wurden fünf klinische Isolate sequenziert. Die Sequenzen waren in Übereinstimmung mit den Literaturdaten und wurden beim Sondendesign berücksichtigt (Tabelle 3.2).

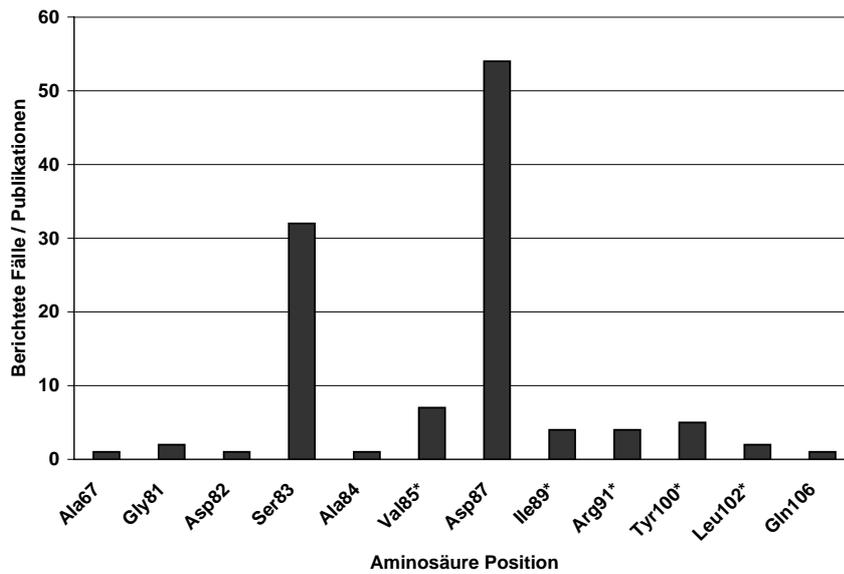


Abbildung 3.2: Publierte Fälle von Chinolon-Resistenz in Abhängigkeit von verschiedenen *gyrA* Mutationen. (Literaturanalyse von Januar 1985 bis Juni 2003 in PubMed, Positionen mit stillen Mutationen sind mit einem Stern gekennzeichnet.)

Tabelle 3.1: Publierte Mutationen in der *gyrA* QRDR Sequenz von verschiedenen *E. coli* Stämmen. Die unterstrichenen Nukleotide kennzeichnen den Nukleotidaustausch im Vergleich zum *E. coli* K12 (accession Nummer AE000312 in GenBank). Die Aminosäure-Substitutionen sind unter dem entsprechenden Nukleotid gezeigt. (Literaturanalyse von Januar 1985 bis Juni 2003 in PubMed)

Aminosäure Position	67	81	82	83	84	85	87	89	91	100	102	106
<i>E. coli</i> K12	GCC <i>Ala</i>	GGT <i>Gly</i>	GAC <i>Asp</i>	TCG <i>Ser</i>	GCG <i>Ala</i>	GTC <i>Val</i>	GAC <i>Asp</i>	ATC <i>Ile</i>	CGC <i>Arg</i>	TAT <i>Tyr</i>	CTG <i>Leu</i>	CAG <i>Gln</i>
	<u>ICC</u> <i>Ser</i>	<u>IGT</u> <i>Cys</i>	<u>GGC</u> <i>Gly</i>	<u>GCG</u> <i>Ala</i>	<u>CCG</u> <i>Pro</i>	<u>GTI</u>	<u>AAC</u> <i>Asn</i>	<u>ATI</u>	<u>CGI</u>	<u>TAC</u>	<u>ITG</u>	<u>CAI</u> <i>His</i>
		<u>GAT</u> <i>Asp</i>		<u>TTG</u> <i>Leu</i>	<u>GCA</u>		<u>CAC</u> <i>His</i>					
				<u>TGG</u> <i>Trp</i>			<u>IAC</u> <i>Tyr</i>					
				<u>GTG</u> <i>Val</i>			<u>GIC</u> <i>Val</i>					
							<u>GGC</u> <i>Gly</i>					
							<u>GGA</u> <i>Gly</i>					

Tabelle 3.2: Mutationen in der *gyrA* QRDR Sequenz von fünf klinischen *E. coli* Stämmen determiniert durch DNS Sequenzierung. Die unterstrichenen Nukleotide kennzeichnen den Nukleotideaustausch im Vergleich zum *E. coli* K12 (accession Nummer AE000312 in Genbank). Die Aminosäure-Substitutionen sind unter dem entsprechenden Nukleotid gezeigt. (Literaturanalyse von Januar 1985 bis Juni 2003 in PubMed)

Aminosäure Position	67	81	82	83	84	85	87	89	91	100	102	106
<i>E. coli</i> K12	GCC <i>Ala</i>	GGT <i>Gly</i>	GAC <i>Asp</i>	TCG <i>Ser</i>	GCG <i>Ala</i>	GTC <i>Val</i>	GAC <i>Asp</i>	ATC <i>Ile</i>	CGC <i>Arg</i>	TAT <i>Tyr</i>	CTG <i>Leu</i>	CAG <i>Gln</i>
<i>E. coli</i> 2				<u>T</u> TG <i>Leu</i>		G <u>T</u> I <u>A</u> AC <i>Asn</i>			<u>C</u> G <u>I</u> <u>T</u> A <u>C</u>			
<i>E. coli</i> 3				<u>T</u> TG <i>Leu</i>		G <u>T</u> I <u>A</u> AC <i>Asn</i>			<u>C</u> G <u>I</u> <u>T</u> A <u>C</u>			
<i>E. coli</i> 4				<u>T</u> TG <i>Leu</i>		G <u>T</u> I <u>A</u> AC <i>Asn</i>			<u>C</u> G <u>I</u> <u>T</u> A <u>C</u>			
<i>E. coli</i> 5				<u>T</u> TG <i>Leu</i>		G <u>T</u> I <u>A</u> AC <i>Asn</i>			<u>C</u> G <u>I</u> <u>T</u> A <u>C</u>			
<i>E. coli</i> 6				<u>T</u> TG <i>Leu</i>		G <u>T</u> I <u>A</u> AC <i>Asn</i>			<u>C</u> G <u>I</u> <u>T</u> A <u>C</u>			

Alle Positionen, die *missense* Mutationen oder stille Mutationen enthalten, wurden hinsichtlich der Anzahl der Veröffentlichungen und deren Beitrag zur Resistenz ausgewertet. Die Positionen 83 und 87 stellten sich als die zuverlässigsten zur Identifizierung der Chinolon-Resistenz heraus. Infolgedessen wurden Sonden entworfen, die auf diese zwei Positionen gerichtet waren. Alle Sonden haben eine Länge von 19 Nukleotiden und die variierende Base zur SNP-Detektion befindet sich in der Mitte. Die Sondensequenzen sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Die Sonden wurden nach folgender Regelung bezeichnet: Sondenname = Genname + Position + Base an SNP-Position + Satznummer. Da die Sequenzanalyse einige Stamm-spezifische stille Mutationen in der Nähe (Position 85 und 89) von *missense* Mutationen (Position 83 und 87) aufdeckte, wurden zwei SONDENSätze (8 Sonden) für Position 83 und acht Sätze (32 Sonden) für Position 87 (vier mit Variation des Nukleotids an der ersten Position des Triplets und vier an der zweiten Position) entworfen. Um die Anzahl der Sonden und somit die Kosten für die klinische Anwendung zu verringern, wurde die Verwendung von Sonden, die an der stille-Mutationsstelle ein Inosin besitzen, erprobt.

Tabelle 3.3: Auf Position 83 und 87 von *E. coli gyrA* gerichtete Sonden unter der Berücksichtigung von stillen Mutationen an Position 85 und 89. Die fett gedruckten Buchstaben kennzeichnen die Nukleotidpositionen mit *missense* Mutationen und die unterstrichenen Buchstaben kennzeichnen die Nukleotidpositionen mit stillen Mutationen. Die universalen Sonden enthielten Inosin, daher konnten Tm und frei Energie (ΔG) der Sekundärstrukturen nicht berechnet werden.

Name	Position	Genotyp	stille Mutation	Sequenz (5' → 3')	Aminosäure	GC %	Tm* (°C)	Hairpin kcal/mol **	Dimer kcal/mol **
GyrA83A1	83	2	85(GTC)	ATGGTGACT AGG CGGT <u>C</u> TA	Stop	53	51	-1,1	-1,5
GyrA83T1	83	2	85(GTC)	ATGGTGACT TGG CGGT <u>C</u> TA	Leu	53	51	-1,1	-1,1
GyrA83G1	83	2	85(GTC)	ATGGTGACT GGG CGGT <u>C</u> TA	Trp	58	53	-1,1	-1,1
GyrA83C1	83	2	85(GTC)	ATGGTGACT CGG CGGT <u>C</u> TA	Ser	58	53	-1,1	-1,1
GyrA83A2	83	1	85(GTT)	ATGGTGACT AGG CGGT <u>I</u> TA	Stop	47	49	0,0	-1,5
GyrA83T2	83	1	85(GTT)	ATGGTGACT TGG CGGT <u>I</u> TA	Leu	47	49	0,0	0,0
GyrA83G2	83	1	85(GTT)	ATGGTGACT GGG CGGT <u>I</u> TA	Trp	53	51	0,0	0,0
GyrA83C2	83	1	85(GTT)	ATGGTGACT CGG CGGT <u>I</u> TA	Ser	53	51	0,0	0,0
GyrA83AU	83	universal	85(GTI)	ATGGTGACT AGG CGGT <u>I</u> TA	Stop	-	-	-	-
GyrA83TU	83	universal	85(GTI)	ATGGTGACT TGG CGGT <u>I</u> TA	Leu	-	-	-	-
GyrA83GU	83	universal	85(GTI)	ATGGTGACT GGG CGGT <u>I</u> TA	Trp	-	-	-	-
GyrA83CU	83	universal	85(GTI)	ATGGTGACT CGG CGGT <u>I</u> TA	Ser	-	-	-	-
GyrA87A1	87	2b	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TATA AC ACGAT <u>I</u> G	Asn	47	49	0,0	-0,1
GyrA87T1	87	2b	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TAT TAC ACGAT <u>I</u> G	Tyr	47	49	0,0	0,0
GyrA87G1	87	2b	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TAT GAC ACGAT <u>I</u> G	Asp	53	51	-1,1	-1,1
GyrA87C1	87	2b	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TAT CAC ACGAT <u>I</u> G	His	53	51	-0,3	-0,3
GyrA87A2	87	1b	85(GTT)/89(ATT)	GCGGT <u>I</u> TATA AC ACGAT <u>I</u> G	Asn	42	47	-0,6	-2,4
GyrA87T2	87	1b	85(GTT)/89(ATT)	GCGGT <u>I</u> TAT TAC ACGAT <u>I</u> G	Tyr	42	47	0,0	0,0
GyrA87G2	87	1b	85(GTT)/89(ATT)	GCGGT <u>I</u> TAT GAC ACGAT <u>I</u> G	Asp	47	49	0,0	0,0
GyrA87C2	87	1b	85(GTT)/89(ATT)	GCGGT <u>I</u> TAT CAC ACGAT <u>I</u> G	His	47	49	-0,3	-0,3
GyrA87A3	87	2a	85(GTC)/89(ATC)	GCGGT <u>C</u> TATA AC ACGAT <u>C</u> G	Asn	53	51	-0,0	-0,1
GyrA87T3	87	2a	85(GTC)/89(ATC)	GCGGT <u>C</u> TAT TAC ACGAT <u>C</u> G	Tyr	53	51	0,0	0,0
GyrA87G3	87	2a	85(GTC)/89(ATC)	GCGGT <u>C</u> TAT GAC ACGAT <u>C</u> G	Asp	58	53	-1,1	-1,1
GyrA87C3	87	2a	85(GTC)/89(ATC)	GCGGT <u>C</u> TAT CAC ACGAT <u>C</u> G	His	58	53	-0,3	-0,3
GyrA87A4	87	1a	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TATA AC ACGAT <u>I</u> G	Asn	47	49	-0,6	-2,4
GyrA87T4	87	1a	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TAT TAC ACGAT <u>I</u> G	Tyr	47	49	0,0	0,0
GyrA87G4	87	1a	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TAT GAC ACGAT <u>I</u> G	Asp	53	51	0,0	0,0
GyrA87C4	87	1a	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TAT CAC ACGAT <u>I</u> G	His	53	51	-0,3	-0,3
GyrA87AU1	87	universal	85(GTI)/89(ATI)	GCGGT <u>I</u> TATA AC ACGAT <u>I</u> G	Asn	-	-	-	-
GyrA87TU1	87	universal	85(GTI)/89(ATI)	GCGGT <u>I</u> TAT TAC ACGAT <u>I</u> G	Tyr	-	-	-	-
GyrA87GU1	87	universal	85(GTI)/89(ATI)	GCGGT <u>I</u> TAT GAC ACGAT <u>I</u> G	Asp	-	-	-	-
GyrA87CU1	87	universal	85(GTI)/89(ATI)	GCGGT <u>I</u> TAT CAC ACGAT <u>I</u> G	His	-	-	-	-
GyrA87A5	87	2b	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TAT GAC ACGAT <u>I</u> G	Asn	53	51	-1,1	-1,1
GyrA87T5	87	2b	85(GTC)/89(ATT)	GCGGT <u>C</u> TAT GT CACGAT <u>I</u> G	Val	53	51	0,0	0,0

Tabelle 3.3 Fortsetzung

Name	Position	Genotyp	stille Mutation	Sequenz (5' → 3')	Aminosäure	GC %	Tm* (°C)	Hairpin kcal/mol**	Dimer kcal/mol**
GyrA87G5	87	2b	85(GTC)/89(ATT)	GCGGTCTATGGCACGATIG	Gly	58	53	0,0	0,0
GyrA87C5	87	2b	85(GTC)/89(ATT)	GCGGTCTATGCCACGATIG	Ala	58	53	0,0	0,0
GyrA87A6	87	1b	85(GTT)/89(ATT)	GCGGTITATGACACGATIG	Asn	47	49	0,0	0,0
GyrA87T6	87	1b	85(GTT)/89(ATT)	GCGGTITATGTCACGATIG	Val	47	49	0,0	0,0
GyrA87G6	87	1b	85(GTT)/89(ATT)	GCGGTITATGGCACGATIG	Gly	53	51	0,0	0,0
GyrA87C6	87	1b	85(GTT)/89(ATT)	GCGGTITATGCCACGATIG	Ala	53	51	0,0	0,0
GyrA87A7	87	2a	85(GTC)/89(ATC)	GCGGTCTATGACACGATCG	Asn	58	53	-1,1	-1,1
GyrA87T7	87	2a	85(GTC)/89(ATC)	GCGGTCTATGTCACGATCG	Val	58	53	0,0	0,0
GyrA87G7	87	2a	85(GTC)/89(ATC)	GCGGTCTATGGCACGATCG	Gly	63	55	0,0	0,0
GyrA87C7	87	2a	85(GTC)/89(ATC)	GCGGTCTATGCCACGATCG	Ala	63	55	0,0	0,0
GyrA87A8	87	1a	85(GTC)/89(ATT)	GCGGTCTATGACACGATIG	Asn	53	51	0,0	0,0
GyrA87T8	87	1a	85(GTC)/89(ATT)	GCGGTCTATGTCACGATIG	Val	53	51	0,0	0,0
GyrA87G8	87	1a	85(GTC)/89(ATT)	GCGGTCTATGGCACGATIG	Gly	58	53	0,0	0,0
GyrA87C8	87	1a	85(GTC)/89(ATT)	GCGGTCTATGCCACGATIG	Ala	58	53	0,0	0,0
GyrA87AU2	87	universal	85(GTI)/89(ATI)	GCGGTITATGACACGATIG	Asn	-	-	-	-
GyrA87TU2	87	universal	85(GTI)/89(ATI)	GCGGTITATGTCACGATIG	Val	-	-	-	-
GyrA87GU2	87	universal	85(GTI)/89(ATI)	GCGGTITATGGCACGATIG	Gly	-	-	-	-
GyrA87CU2	87	universal	85(GTI)/8ATI)	GCGGTITATGCCACGATIG	Ala	-	-	-	-

* Tm wurde berechnet mittels OligoCalculator (<http://trishul.sci.gu.edu.au/tools/OligoCalculator.html>) unter Verwendung von 0.195M Salzkonzentration (1x SSC).

** ΔG der Sekundärstrukturen wurde berechnet mit Hilfe von Software Array Designer, deren Kalkulation auf der Methode von SantaLucia basiert⁷⁴.

3.1.2 Validierung der Sonden unter Verwendung von Poly-L-Lysin-Objektträgern

Die Spezifität der Sonden und die Anwendbarkeit für klinische Isolate wurden mit 30 klinischen *E. coli* Isolaten (*E. coli* 1 – *E. coli* 30) aus vier unterschiedlichen Krankenhäusern in Deutschland validiert. Aus Kostengründen wurden preiswerte PLL-Objektträger verwendet. Alle Experimente wurden mit 4 pmol Ziel-DNS und drei Stunden Hybridisierung durchgeführt.

Zuerst wurde die Spezifität der Sonden mit fünf sequenzierten Isolaten überprüft. Um den *cut-off*-Wert für ein signifikantes Signal für die weitere Analyse definieren zu können, wurden wiederholt Experimente mit diesen fünf Isolaten durchgeführt. Anhand dieser Experimente wurde festgelegt, dass die PM-Intensität höher als Tausend und das Verhältnis zwischen PM-Intensität und MM-Intensität über Vier sein sollt. Die Gel-Elektrophorese und die Mikroarray-Ergebnisse der restlichen 25 Isolate werden in Abbildung 3.3 und Tabelle 3.4 gezeigt. Die PM-Intensitäten und die PM/MM-Verhältnisse alle dieser Isolate waren über dem *cut-off*-Wert. Die Mikroarray-Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit dem Resultat der direkten DNS-Sequenzierung und stimmten mit den Standard Resistenztests überein.

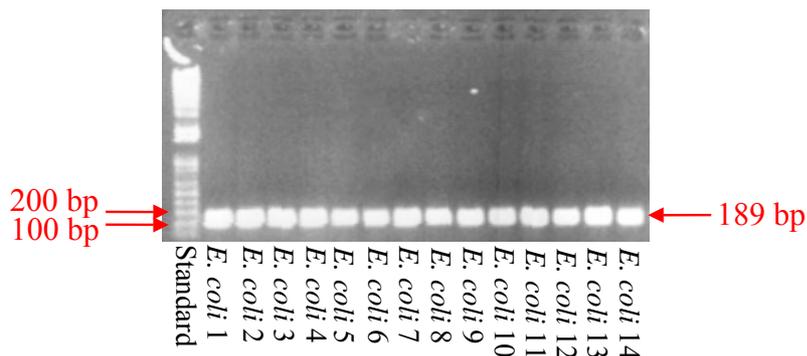


Abbildung 3.3: Gel-Elektrophorese des *gyrA*-Amplikons. (Als Beispiel werden hier nur 14 *E. coli* Isolate gezeigt.)

Tabelle 3.4: Mikroarray-Daten der 25 klinischen Isolate

Nummer	Aminosäure (83)	PM-Intensität (83)	PM/MM (83)	Aminosäure (87)	PM-Intensität (87)	PM/MM (87)
<i>E. coli</i> 1	TCG (Ser)	4217	10.8	Asp (GAC)	1494	7.1
<i>E. coli</i> 7	TTG (Leu)	16802	5.0	Asn (AAC)	3377	13.0
<i>E. coli</i> 8	TTG (Leu)	28423	4.6	Asn (AAC)	4508	14.0
<i>E. coli</i> 9	TTG (Leu)	7009	4.8	Asn (AAC)	1732	10.0
<i>E. coli</i> 10	TTG (Leu)	12029	5.2	Asn (AAC)	3005	5.9
<i>E. coli</i> 11	TTG (Leu)	16264	5.7	Asn (AAC)	4795	9.9
<i>E. coli</i> 12	TTG (Leu)	4229	6.2	Asn (AAC)	937	7.3
<i>E. coli</i> 13	TTG (Leu)	8964	5.2	Asn (AAC)	2039	7.8
<i>E. coli</i> 14	TTG (Leu)	5459	4.8	Asn (AAC)	1161	8.5
<i>E. coli</i> 15	TTG (Leu)	5637	4.9	Asn (AAC)	1436	7.3
<i>E. coli</i> 16	TTG (Leu)	19848	4.9	Asn (AAC)	5671	12.0
<i>E. coli</i> 17	TTG (Leu)	7878	5.7	Asn (AAC)	1994	10.4
<i>E. coli</i> 18	TTG (Leu)	25012	4.5	Asn (AAC)	4842	6.6
<i>E. coli</i> 19	TTG (Leu)	24283	6.5	Asn (AAC)	6375	10.4
<i>E. coli</i> 20	TTG (Leu)	10870	4.9	Asn (AAC)	2509	7.3
<i>E. coli</i> 21	TTG (Leu)	14895	6.2	Asn (AAC)	4366	12.1
<i>E. coli</i> 22	TTG (Leu)	14402	4.6	Asn (AAC)	5582	10.3
<i>E. coli</i> 23	TTG (Leu)	24271	7.1	Asn (AAC)	2872	5.6
<i>E. coli</i> 24	TTG (Leu)	18038	8.2	Asn (AAC)	4295	14.9
<i>E. coli</i> 25	TTG (Leu)	11857	6.4	Asn (AAC)	1694	10.3
<i>E. coli</i> 26	TTG (Leu)	20111	7.5	Tyr (TAC)	2407	11.5
<i>E. coli</i> 27	TTG (Leu)	22196	4.0	Asn (AAC)	7378	10.8
<i>E. coli</i> 28	TCG (Ser)	15968	14.1	Gly (GGC)	3910	24.6
<i>E. coli</i> 29	TTG (Leu)	9917	5.1	Asn (AAC)	2482	17.3
<i>E. coli</i> 30	TTG (Leu)	13254	4.3	Asn (AAC)	2827	11.7

Drei Beispiele (ein sensitives *E. coli*: *E. coli* 1 und zwei resistente *E. coli* mit zwei unterschiedlichen Genotypen: *E. coli* 5 und *E. coli* 8) für Position 83 werden in Abbildung 3.5 gezeigt. Abbildung 3.4 zeigt einen Teil des Mikroarray-Layouts (Position 83). Die unterschiedlichen Hybridisierungsmuster der Chinolon-sensitiven und Chinolon-resistenten *E. coli* und der verschiedenen *E. coli* Genotypen konnten

deutlich beobachtet werden. Das sensitive *E. coli* zeigte ein Signal für Serin (A), während beide resistente *E. coli* ein Hybridisierungssignal für Leucin zeigten (B-C). In Anbetracht der Intensität von unterschiedlichen Sondensätzen einer Aminosäureposition wurde das sensitive *E. coli* für Genotyp 2 (D) festgestellt, während die Genotypen der zwei resistenten *E. coli* zwischen Genotyp 1 (F) und Genotyp 2 (E) variieren. Die Identifikation war eindeutig, da die Intensitäten der PM-Sonden mindestens fünffach stärker als die der MM-Sonden waren und die Genotyp-spezifischen PM-Signale mindestens zweifach höher als die der nicht dem Genotyp entsprechenden Sonden waren.

	Universal	Genotyp 1	Genotyp 2
Stop	GyrA83AU	GyrA83A1	GyrA83A2
Leu	GyrA83TU	GyrA83T1	GyrA83T2
Trp	GyrA83GU	GyrA83G1	GyrA83G2
Ser	GyrA83CU	GyrA83C1	GyrA83C2

Abbildung 3.4: Layout des *gyrA*-Arrays (Position 83)

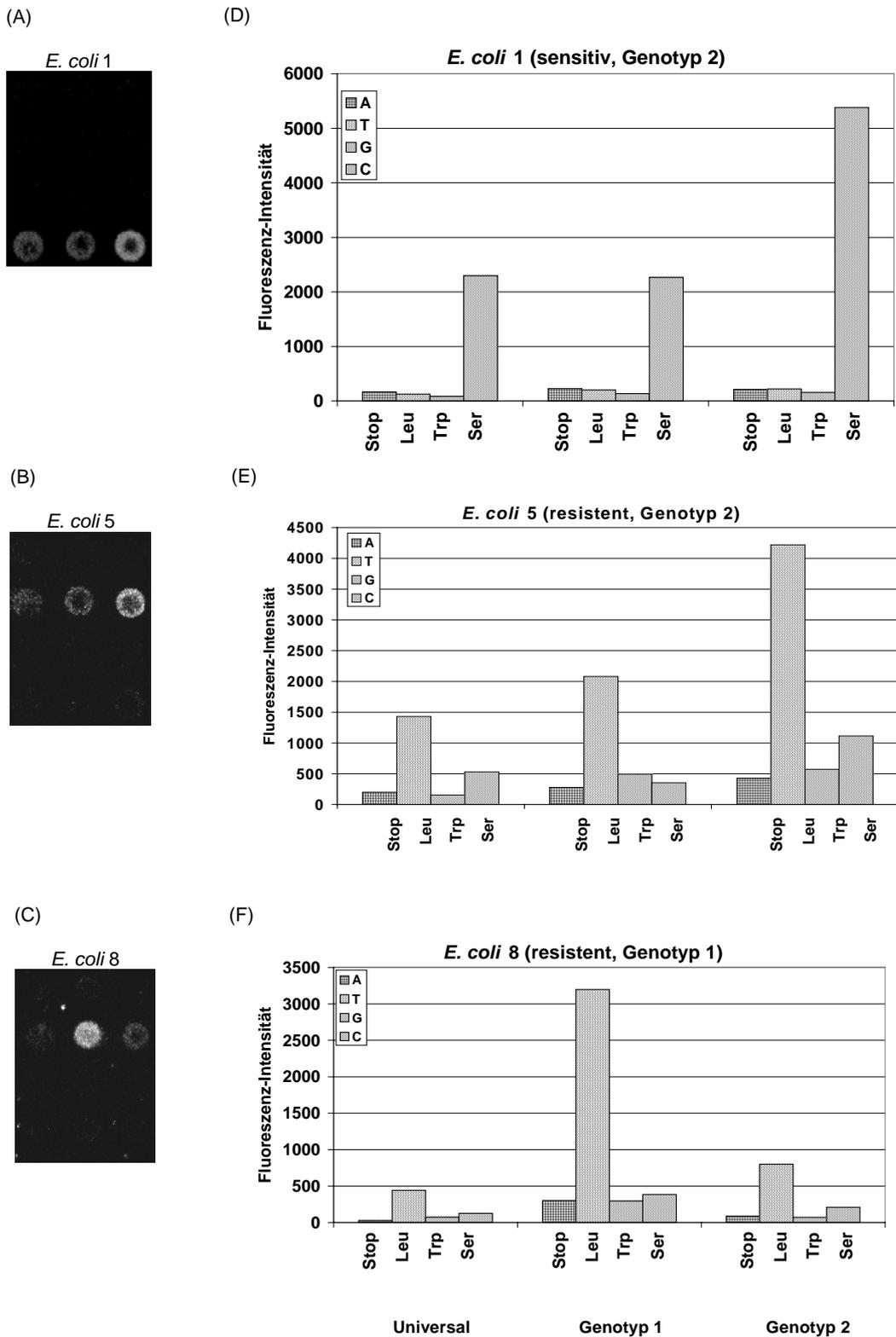


Abbildung 3.5: Mikroarray-Ergebnisse von drei klinischen *E. coli* Isolaten nach drei Stunden Hybridisierung mit 4 pmol Ziel-DNS¹⁰³. A – C: Mikroarray-Bilder von *E. coli* Isolat 1, 5 und 8; D – F: quantitative Analyse des Fluoreszenzsignals von *E. coli* Isolat 1, 5 und 8.

Tabelle 3.5 zeigt einen Überblick über die Genotypen aller 30 klinischen Isolate, die mittels spezifischer Sonden des Mikroarrays detektiert wurden. Für die Bestimmung des Phänotyps wurde Ciprofloxacin allein oder Ciprofloxacin in Kombination mit Levofloxacin verwendet. Insgesamt wurden 29 Chinolon-resistente *E. coli* und ein Chinolon-sensitives *E. coli* identifiziert. Das Chinolon-sensitive Isolat hatte keine Veränderung in den Aminosäurepositionen 83 und 87. Von der Chinolon-resistenten *E. coli* enthielten 27 Isolate sowohl Mutation S83L als auch D87N. Für ein Chinolon-resistentes Isolat wurden die Mutationen S83L und D87Y gefunden. Nur ein Chinolon-resistentes Isolat hatte eine einzelne Mutation D87G. Die Isolate konnten in zwei Genotypen in Bezug auf ihre stillen Mutationen in Position 85, 91 und 100 eingeteilt werden. Genotyp 1 enthielt GTC in Position 85, CGC in Position 91 und TAT in Position 100. Genotyp 2 hatte GTT in Position 85, CGT in Position 91 und TAC in Position 100. Von den untersuchten 30 klinischen Isolaten gehörten drei Isolate zu Genotyp 1 und 27 Isolate, einschließlich des sensitiven, gehörten zu Genotyp 2.

Tabelle 3.5: Genotypen der 30 klinischen Isolate (Fettgedruckte Buchstaben zeigen die Positionen mit *missense* Mutationen an, unterstrichenen Buchstaben zeigen die Positionen mit stillen Mutationen an. Die mit Sternen gekennzeichneten Positionen liegen außerhalb des Sondenbereichs, und wurden daher mittels einer Sequenzierung ermittelt.)

Aminosäure Position	67*	81	82	83	84	85	87	89	91*	100*	102*	106*	
<i>E. coli</i> K12	GCC <i>Ala</i>	GGT <i>Gly</i>	GAC <i>Asp</i>	TCG <i>Ser</i>	GCG <i>Ala</i>	GTC <i>Val</i>	GAC <i>Asp</i>	ATC <i>Ile</i>	CGC <i>Arg</i>	TAT <i>Tyr</i>	CTG <i>Leu</i>	CAG <i>Gln</i>	Phenotype
1 Isolate				TCG <i>Ser</i>		<u>GTC</u>	GAC <i>Asp</i>		<u>CGC</u>	<u>TAT</u>			sensitive
3 Isolaten				TTG <i>Leu</i>		<u>GTC</u>	AAC <i>Asn</i>		<u>CGC</u>	<u>TAT</u>			resistent
24 Isolaten				TTG <i>Leu</i>		<u>GTC</u>	AAC <i>Asn</i>		<u>CGC</u>	<u>TAT</u>			resistent
1 Isolate				TTG <i>Leu</i>		<u>GTC</u>	TAC <i>Tyr</i>		<u>CGC</u>	<u>TAT</u>			resistent
1 Isolate				TCG <i>Ser</i>		<u>GTC</u>	GGC <i>Gly</i>		<u>CGC</u>	<u>TAT</u>			resistent

3.1.3 Prüfung des Arrays-Verhaltens unter Verwendung von Epoxid-Objektträgern

Aufgrund des starken Hintergrundsignals der PLL-Objektträger wurde das System auf Epoxid-Objektträger umgestellt. Ziel ist die Sensitivität des Tests zu erhöhen und die Testzeit zu reduzieren. Um die Funktion des Arrays auf dieser Oberfläche festzustellen, wurde je ein Isolat mit unterschiedlicher Kombination von Mutationen willkürlich zur Array-Untersuchung herangezogen. Abbildung 3.6 zeigt die Hybridisierungsergebnisse und die Fluoreszenzintensitäten von einem sensitiven (*E. coli* 1) und zwei resistenten (*E. coli* 5 und 8) klinischen Isolaten nach einer Stunde

Hybridisierung. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass eine klare Unterscheidung zwischen den resistenten und sensitiven Isolaten, sowie den unterschiedlichen Genotypen getroffen werden konnte. Alle anderen untersuchten Isolate konnten hinsichtlich der *missense* Mutationen in Position 83 und 87 und deren Stamm-spezifischen stillen Mutationen unter Verwendung von Epoxid-Objektträgern genauso korrekt identifiziert werden. Aus den repetitiven Experimenten mit einem klinischen Isolat (*E. coli* 5), wurden die *cut-off*-Werte der Fluoreszenzintensitäten für die weitere Analyse definiert. Diesem Ergebnis zufolge sollte die Intensität des PM für eine Position höher als 300 sein, und das PM/MM-Verhältnis höher als 1.5 sein. Für alle nachfolgenden Versuche wurden Epoxid-Objektträger verwendet.

Im neuen System wurden vier Kontrollsonden eingeführt. Jeder Schritt im Mikroarray-Experiment wurde mit diesen vier Sonden überprüft. Die Druck-Kontrollsonde sollte wegen einer Cy5 Modifikation am 5' Ende immer ein Signal zeigen, ebenso die Hybridisierungs-Kontrollsonde aufgrund eines in der Hybridierungslösung zugegebenen fluoreszenzmarkierten komplementären Oligonukleotids. Fehlende Signale dieser zwei Kontrollsonden zeigten Druck-Ausfälle bzw. Störungen im Hybridisierungsschritt an. Signal wurde auch bei der Prozess-Kontrollsonde erwartet, die einer Konsensussequenz von *gyrA* entspricht. Bei der Verwendung dieser Sonde wurde zusätzlich zur Druck-Kontrolle und Hybridisierungs-Kontrolle die Effizienz der Markierungs-PCR überwacht. Im Gegenteil dazu sollte kein Signal bei der Negativ-Hybridisierungs-Kontrollsonde auftreten. Vorhandensein des Signals zeigte eine Kontamination während des Druckens an. Arrays, die kein sichtbares Signal bei den ersten drei Kontrollsonden oder nachweisbares Signal bei der Negativ-Hybridisierungs-Kontrollsonde zeigten, wurden von der weiteren Analyse in dieser Arbeit ausgeschlossen.

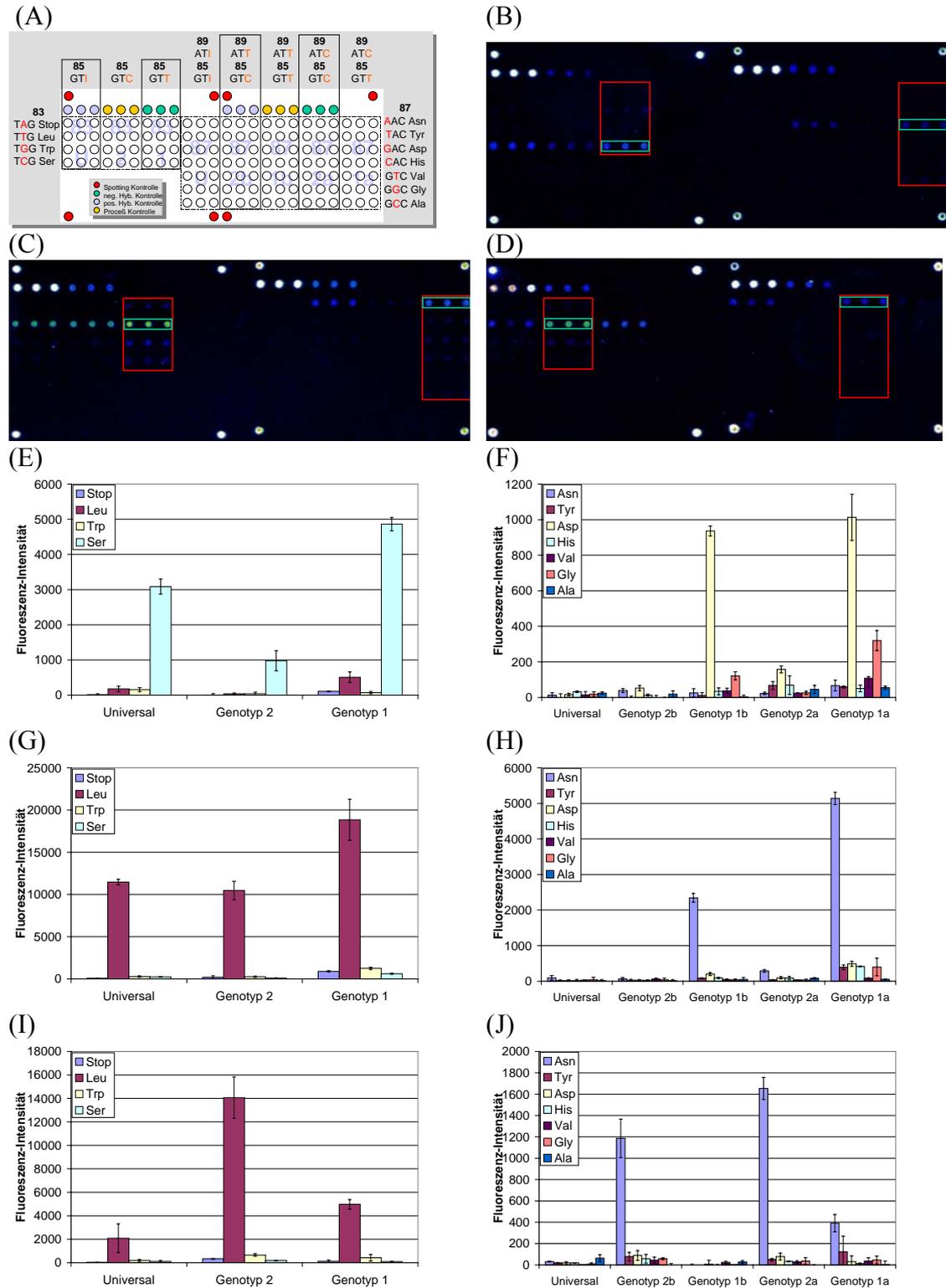


Abbildung 3.6: Mikroarray-Ergebnisse von drei klinischen *E. coli* Isolaten nach drei Stunden Hybridisierung mit 1 pmol Ziel-DNS. A: Mikroarray-Layout; B-D: Fluoreszenz-Bilder von einem Chinolon-sensitiven *E. coli* (*E. coli* 1), Genotyp 1 (B) und zwei Chinolon-resistenten *E. coli*: Genotyp 1 (*E. coli* 5) (C) und Genotyp 2 (*E. coli* 8) (D); E und F: Quantifikation der Bilder B; G und H: Quantifikation der Bilder C; I und J: Quantifikation der Bilder D; E, G und I: Position 83; F, H und J: Position 87. (Der rote Rahmen zeigt den korrekten Genotyp und der grüne Rahmen zeigt den PM-Spot.)

3.1.4 Optimierung des *gyrA*-Arrays auf Epoxid-Objektträgern

3.1.4.1 Optimierung der Markierungs-PCR

Um kleine DNS-Mengen detektieren zu können bzw. um Fluoreszenzfarbstoff einbauen zu können, ist ein Amplifikations-Schritt notwendig. In dieser Arbeit wurde PCR zu diesem Zweck verwendet. Die hohe Empfindlichkeit des Systems wurde durch die Optimierung des Markierungs-PCR bezüglich der DNS-Ausbeute und der Einbaurrate des Fluoreszenzfarbstoffes erzielt. Parameter wie Annealing-Temperatur, Anzahl der Zyklen, Mg^{2+} Konzentration, Verhältnis zwischen nicht markiertem und markiertem dCTP und Menge der *Taq* Polymerase, die einen Einfluss auf diese zwei Faktoren haben, wurden für die Optimierung ausgewählt. Drei unabhängige PCR-Reaktionen wurden für jede Bedingung angesetzt und die Mittelwerte der DNS-Ausbeute und der Einbaurrate wurden aus diese drei Reaktionen berechnet. Abbildungen 3.7 - 3.12 zeigen die Menge des Amplikons und die Einbaurrate des Fluoreszenzfarbstoffes für jeden Parameter.

Annealing-Temperatur

Der Vergleich unterschiedlicher Annealing-Temperaturen wird in Abbildung 3.7 gezeigt. Das Resultat bei 50°C und 55°C war ähnlich, während bei 60°C eine erhebliche Abnahme des PCR-Produktes beobachtet wurde. Da höhere Annealing-Temperaturen die spezifische Amplifikation begünstigten, wurde eine Temperatur von 55°C zur weiteren Optimierung gewählt.

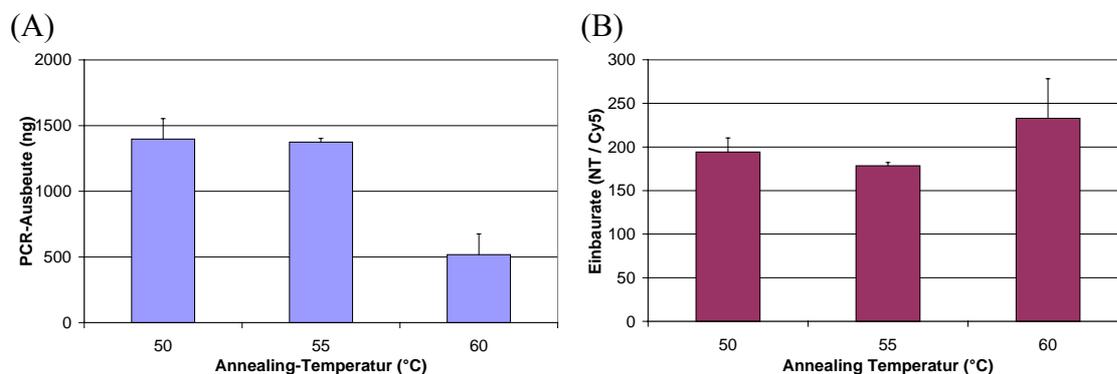


Abbildung 3.7: Der Einfluss von verschiedenen Annealing-Temperaturen auf die DNS-Ausbeute (A) und Einbaurrate (B) bei der Markierungs-PCR, n=3.

Anzahl der Zyklen

Unterschiedliche Zyklenzahlen zwischen 20 und 40 (Abbildung 3.8) hatten keinen Einfluss auf die Einbaurrate, aber die DNS-Ausbeute erhöhte sich wie erwartet mit erhöhter Zyklenzahl. Um soviel Ziel-DNS wie möglich für die Hybridisierungsversuche zu erhalten, wurden 40 Zyklen zur weiteren Optimierung eingesetzt. Für einzelne Mikroarray-Versuche reichten jedoch 30 Zyklen völlig aus.

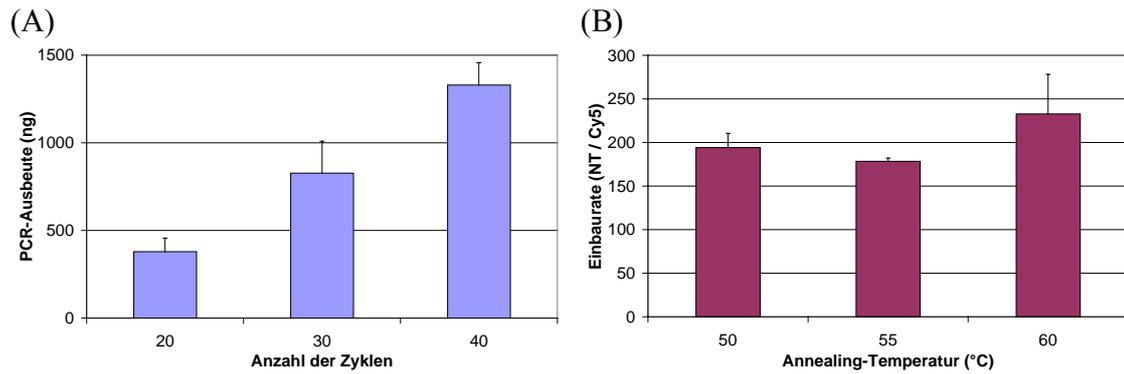


Abbildung 3.8: Der Einfluss der Zyklenanzahl auf DNS-Ausbeute (A) und Einbaurrate (B) bei der Markierungs-PCR, n=3.

Mg²⁺ Konzentration

Erstaunlicherweise verursachte eine steigende Mg²⁺-Konzentration von 1.5 bis 4.5 mM (Abbildung 3.9) nicht eine wesentlich bessere Ausbeute des PCR-Produktes. Obwohl die Einbaurrate sich mit steigender Mg²⁺-Konzentration verbesserte, wurde unspezifische Amplifikation bei Verwendung von 3.0 und 4.5 mM Mg²⁺ beobachtet. Infolgedessen wurde 1.5 mM Mg²⁺ zur weiteren Optimierung ausgewählt

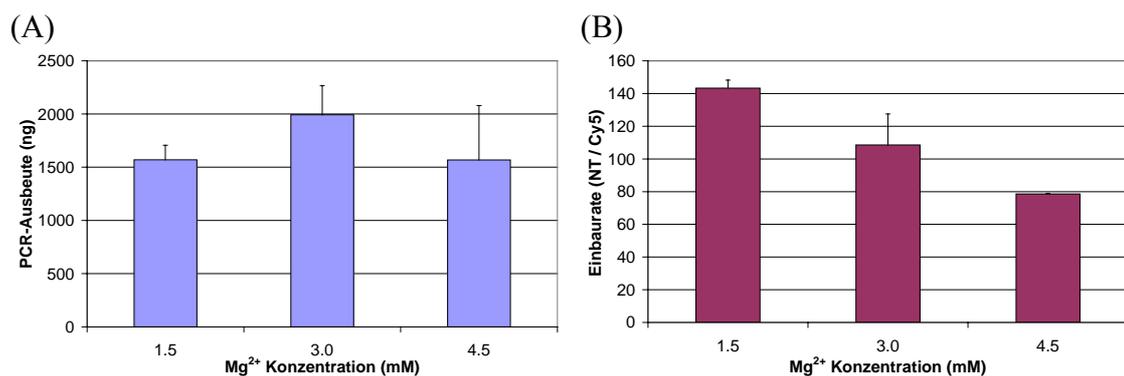


Abbildung 3.9: Der Einfluss der Mg²⁺ Konzentration auf die DNS-Ausbeute (A) und die Einbaurrate (B) bei der Markierungs-PCR, n=3.

Verhältnis von nicht markiertem und markiertem dCTP

Das große Cy-Molekül stört die Polymerase-Ketten-Reaktion. Dennoch ist eine ausreichende Menge an eingebauten Cy-Molekülen für eine hohe Sensitivität des Tests notwendig. Um optimale Bedingungen herauszufinden, wurden nicht markierte und markierte dCTP Nukleotide in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Abbildung 3.10 zeigt das Optimierungsergebnis. Mit erhöhtem Anteil des markierten dCTP bei einer konstanten dCTP-Gesamtmenge, verbesserte sich die Einbaurrate, während sich die DNS-Ausbeute kontinuierlich verringerte. Als Kompromiss zwischen diesen zwei Faktoren und unter der Berücksichtigung der Kosten wurden zur weiteren Optimierung ein drei zu zwei Verhältnis (von nicht markiertem zu markiertem) dCTP verwendet.

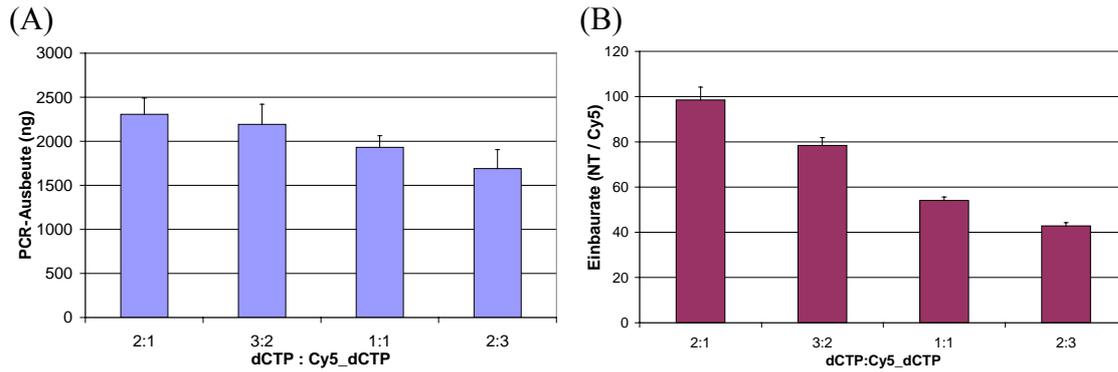


Abbildung 3.10: Der Einfluss des Verhältnisses zwischen nicht markiertem und markiertem dCTP auf die DNS-Ausbeute (A) und die Einbaurate (B) bei der Markierungs-PCR, n=3.

Enzym-Menge

Mit erhöhter Polymerasemenge (Abbildung 3.11) erhöhte sich die das DNS-Ausbeute wie erwartet. Erstaunlicherweise erhöhte sich die Einbaurate ebenfalls. Aus Kostengründen wurden weitere Untersuchungen mit mehr Enzym nicht durchgeführt und eine Menge von 10 U Polymerase für die PCR ausgewählt.

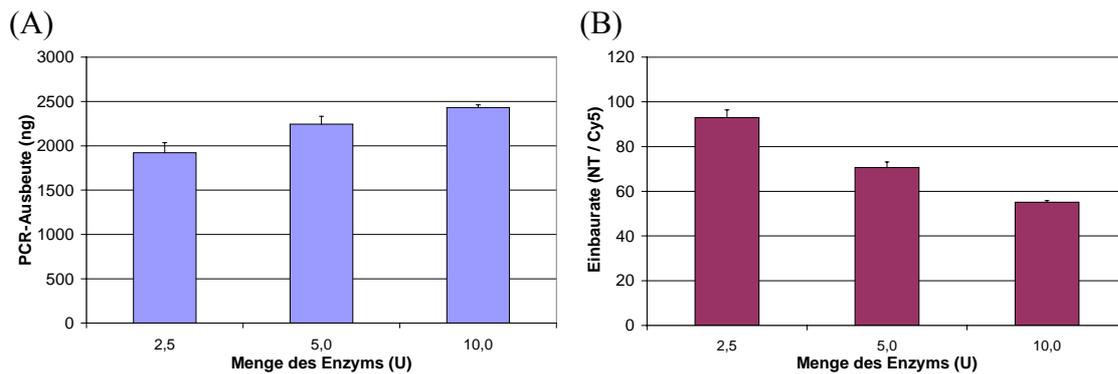


Abbildung 3.11: Der Einfluss der Menge von *Taq* Polymerase auf die DNS-Ausbeute (A) und Einbaurate (B) bei der Markierungs-PCR, n=3.

Template Menge

Um die Wirkung von unterschiedlicher Template-Menge auf die Markierungs-PCR festzustellen, wurden 92 pg bis 92 ng Template unter Verwendung der oben optimierten Bedingungen für die PCR eingesetzt. Wie in Abbildung 3.12 gezeigt, erhöhte sich sowohl die das DNS-Ausbeute als auch die Einbaurate bei zunehmender Template-Menge. 92 pg DNS als das Ausgangsmaterial ergab nach 40 Zyklen über 1500 ng PCR-Produkt mit einer Einbaurate von 80 NT/Cy5. Sowohl die erhaltene Menge der Ziel-DNS als auch ihre Einbaurate waren ausreichend für mehr als 10 Array-Versuche, was darauf hindeutet, dass das PCR-Limit weit unter 92 pg lag. Weitere Versuche mit weniger Template wurden durchgeführt, die im nächsten Abschnitt beschrieben werden.

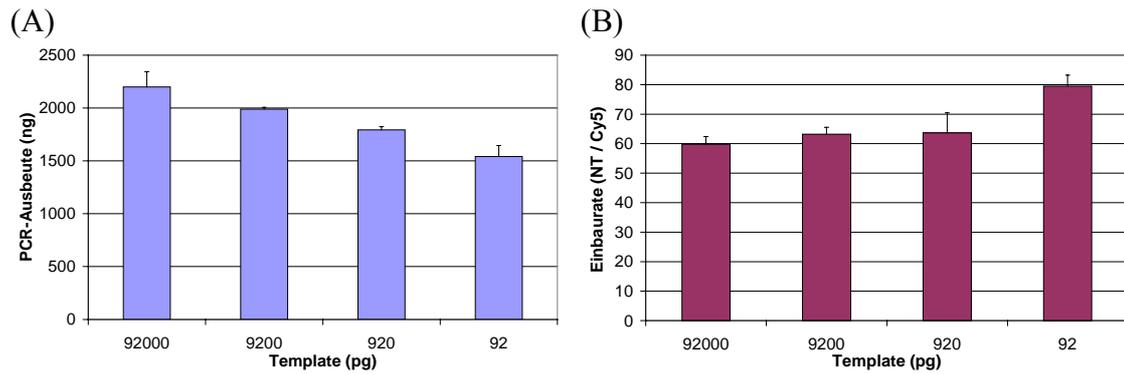


Abbildung 3.12: Der Einfluss der Menge der Template auf die DNS-Ausbeute (A) und Einbaurate (B) bei der Markierungs-PCR, n=3.

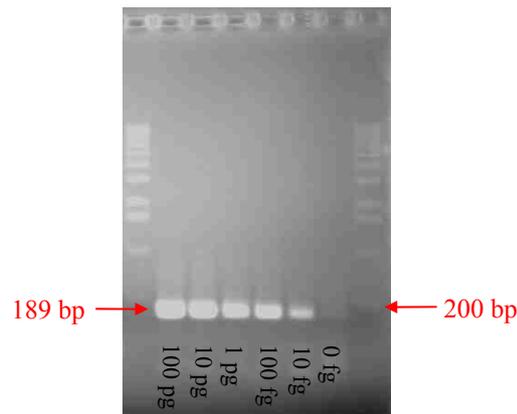
Nach Optimierung aller obenerwähnten Parameter, wurden die Bedingungen für das Markierungs-PCR festgelegt:

- Annealing-Temperatur: 55°C,
- Mg²⁺ Konzentration: 1.5mM
- dCTP-Verhältnis: 3 : 2 (nicht markiertes : markiertes)
- Menge der *Taq* Polymerase: 10 U
- Zyklen: 30

Sensitivitätstest

Für die Bestimmung der Sensitivitätsgrenze der Markierungs-PCR wurde Template-DNS (*E. coli* 5) von 100 pg bis zu 10 fg (entspricht einer *E. coli* Zelle) in Zehnerpotenz-Schritten verdünnt und für die PCR eingesetzt. Das Bild nach der Gelelektrophorese (Abbildung 3.13A) zeigt zwar die Abnahme des PCR-Produkts mit abnehmendem Template, aber bei bis zu 10 fg Template DNS ist eine sichtbare Bande zu sehen. Für die Hybridisierung wurde 1 pmol amplifizierte Ziel-DNS verwendet, die aus 10 fg Ausgangsmaterial gewonnen werden konnte. Das korrekte Hybridisierungsmuster (Abbildung 3.13B) deutet darauf hin, dass die Markierungs-PCR unter Verwendung der optimierten Bedingungen in der Lage ist, bis zu einer *E. coli* Zelle zu amplifizieren und die Chinolon-Resistenz mittels Mikroarrays zu detektieren. Allerdings entspricht die Verdünnung der DNS in Wasser noch nicht der realen Situation in der klinischen Anwendung. In der realen Kliniksituation können andere Aufforderungen auftauchen, wie z.B. die direkte DNS-Extraktion aus Patientproben und ungleichmäßige Verteilung der DNS in Lösung. Daher wurden weitere Versuche mit aufgestockten Realproben (*E. coli* in Urin) durchgeführt, was in Abschnitt 3.2.2.6 beschrieben wird.

(A)



(B)

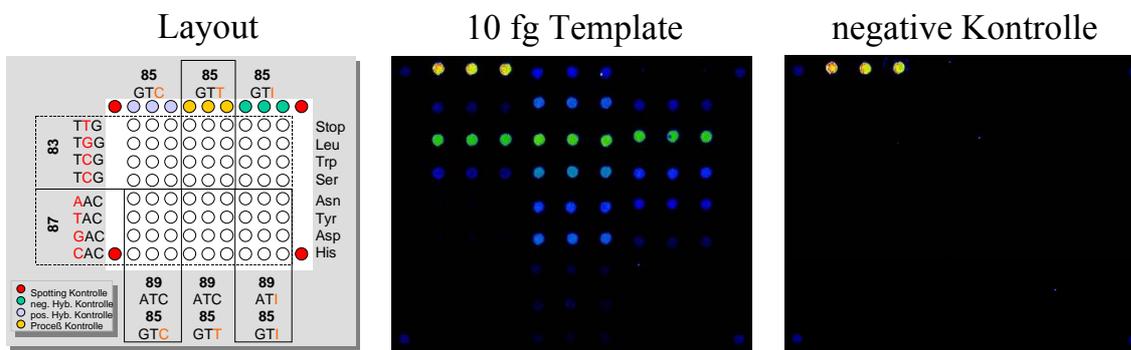


Abbildung 3.13: Sensitivitätstest der Markierungs-PCR. A: Bild nach der Gelelektrophorese; B: Mikroarray-Bild nach einer Stunde Hybridisierung

3.1.4.2 Optimierung der Hybridisierung

Der nächste wichtige Schritt im Mikroarray-Experiment ist die Hybridisierung, die für die Sensitivität und Spezifität des Tests entscheidend ist. Hinsichtlich dieser zwei Kriterien wurde die Hybridisierung optimiert. Parameter, die einen Einfluss auf diese zwei Faktoren haben können, wurden für die Optimierung gewählt, wie Hybridisierungstemperatur, Vorbehandlung der Ziel-DNS, Hybridisierungszeit, Einbaurrate, Typ des Cyaninfarbstoffs und Länge des Poly-dT-Spacers als Abstandhalter. Um einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Bedingungen zu ermöglichen, wurden die Intensität des PM (höchste Intensität unter vier Sonden für eine SNP-Position) und Verhältnis zwischen PM und MM ($PM/MM = \text{Intensität des PM} / \text{Mittelwert der MM-Intensitäten}$) verwendet, um die Sensitivität bzw. die Spezifität auszuwerten. Je drei Arrays mit Triplikaten wurden für jede Bedingung eingesetzt. Mittelwerte von neun Spots wurden ermittelt. Die Versuche wurden konsistent mit einem Isolat (*E. coli* 5) durchgeführt. Dabei wurden nur jeweils drei für dieses Isolat relevante SONDENSÄTZE für Position 83 bzw. 87 verwendet. Das Layout ist in Abbildung 3.13B dargestellt. Alle Hybridisierungen erfolgten mit 1 pmol markierter DNS. Es ist zu bemerken, dass in allen Experimenten die Sonden für Position 83 eine höhere Intensität erzielten als die Sonden für Position 87 und die Intensitäten der universellen Sonden niedriger waren als die der spezifische Sonden.

Hybridisierungstemperatur

Mit steigender Hybridisierungstemperatur (Abbildung 3.14) von 35°C bis 55°C in 10°C Schritten, verringerte sich die Intensität des PM, während das Intensitätsverhältnis von PM/MM anstieg. Als Kompromiss wurde eine Hybridisierungstemperatur von 45°C zur weiteren Optimierung eingesetzt.

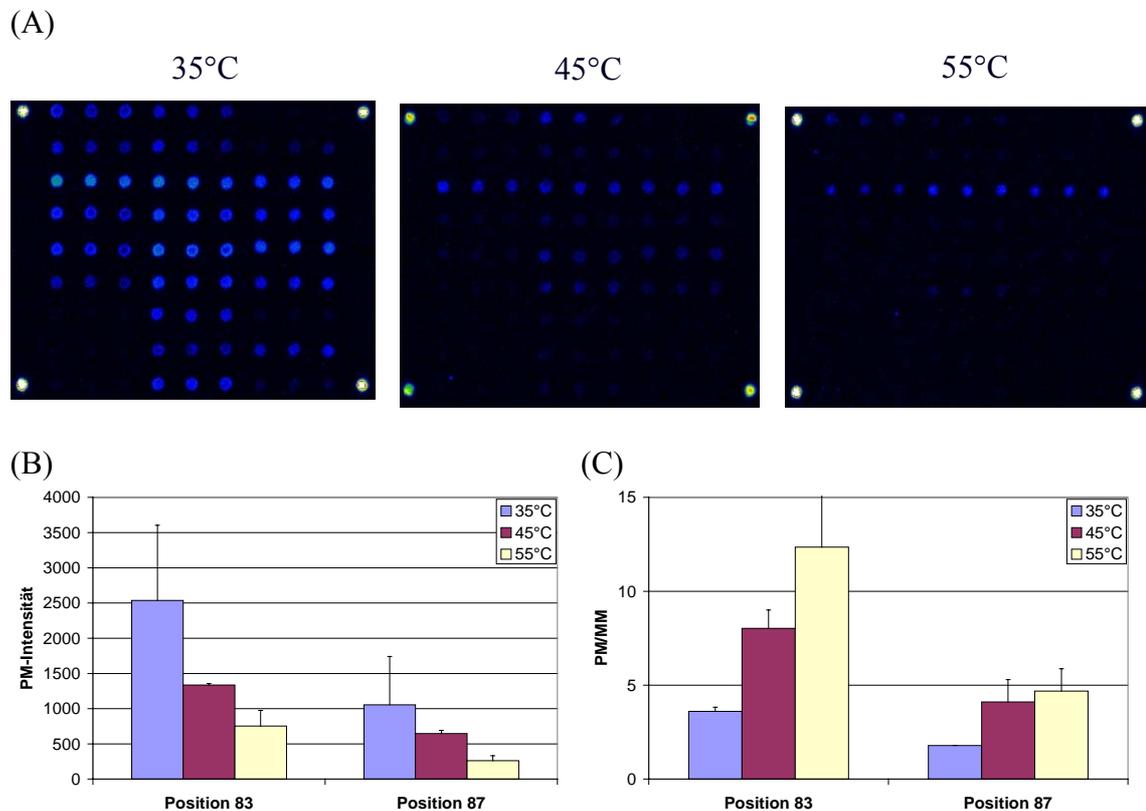
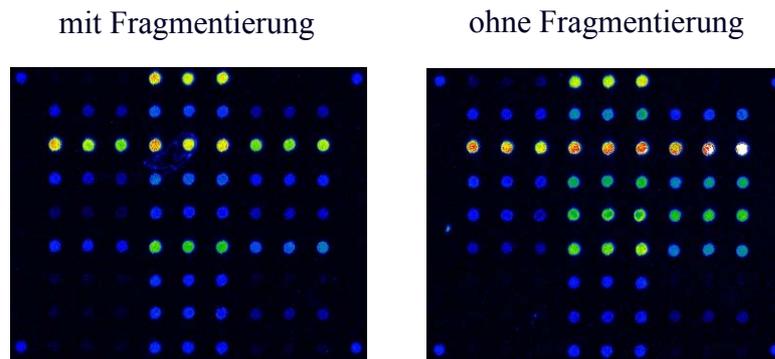


Abbildung 3.14: Der Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=9$. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis.

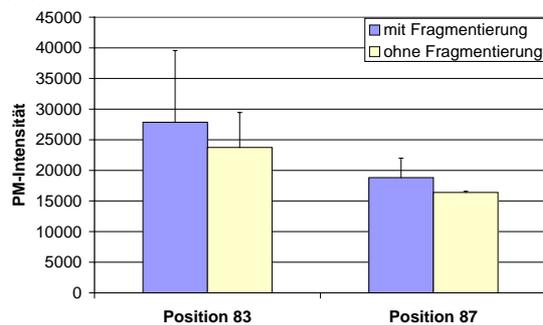
Vorbereitung der Ziel-DNS

Im Allgemeinen wurde die Ziel-DNS mit DNase fragmentiert, um potentielle Sekundärstrukturen zu zerstören. Damit wurde ein einigermaßen gleichmäßiges Signal erhalten und eine bessere Zugänglichkeit der Sonden-DNS erreicht. Ein Vergleich zwischen der fragmentierten und der nicht fragmentierten DNS zeigt (Abbildung 3.15), dass keine wesentliche Verbesserung durch die Fragmentierung erzielt wurde. Um die Testzeit zu reduzieren, wurde auf die Fragmentierung in weiteren Experimenten verzichtet.

(A)



(B)



(C)

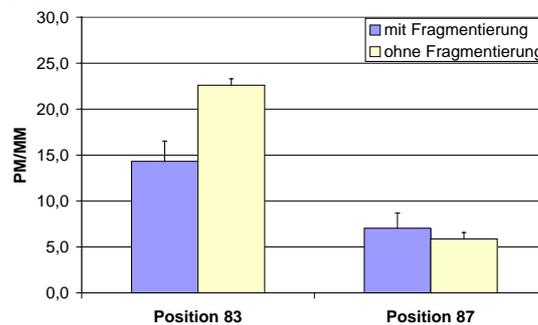


Abbildung 3.15: Der Einfluss der Vorbehandlung der Ziel-DNS auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, n=9. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis.

Hybridisierungszeit

Mit zunehmender Hybridisierungszeit von einer Stunde bis zu sieben Stunden in zwei Stunden-Schritten erhöhte sich sowohl die Intensität des PM als auch das Verhältnis von PM/MM, mit Ausnahme der fünfstündigen Hybridisierung hier fand eine geringfügige Abnahme des PM/MM-Verhältnisses statt (Abbildung 3.16). Obwohl eine längere Hybridisierungszeit eine positive Wirkung auf die Hybridisierung hatte, verringerte sich jedoch die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis (ausgenommen das PM/MM für Position 83) nach einer Hybridisierungszeit von 24 Stunden. Hybridisierungszeiten bis zu 7 Stunden erzielten zwar eine höhere PM-Intensität und einen größeren PM/MM-Wert, aber eine Hybridisierung von einer Stunde war bereits ausreichend, um das PM zu identifizieren. Da die Verringerung der Testzeit sehr wichtig für die klinische Anwendung ist, wurde eine Hybridisierungszeit von einer Stunde für weitere Experimente ausgewählt.

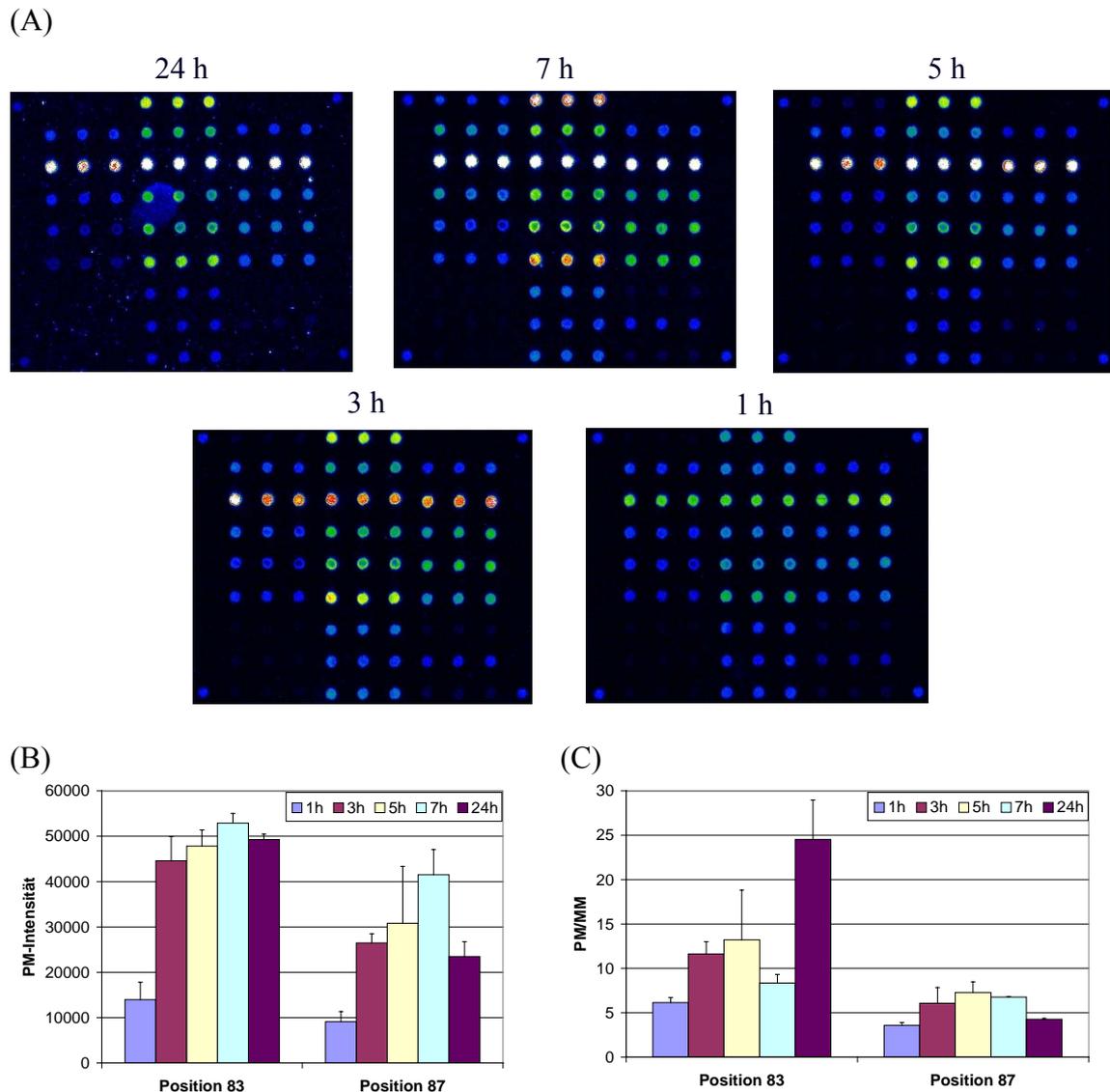


Abbildung 3.16: Der Einfluss der Hybridisierungszeit auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=9$. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis.

Einbaurate

Abbildung 3.17 zeigt den Einfluss der Einbaurate (47, 85 und 161 NT/Cy5) auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis. Die Intensität des PM stieg mit besserer Einbaurate wie erwartet. Die beste Einbaurate hierfür war 47 NT/Cy5. Der Einfluss auf das PM/MM-Verhältnis war nicht deutlich zu beobachten. Es wurde selbst mit einer Einbaurate von 47 NT/Cy5 kein Quench-Effekt durch die hohe Markierungsdichte beobachtet. Somit konnte eine Ziel-DNS mit effizienterer Einbaurate ein besseres Hybridisierungsergebnis erzielen.

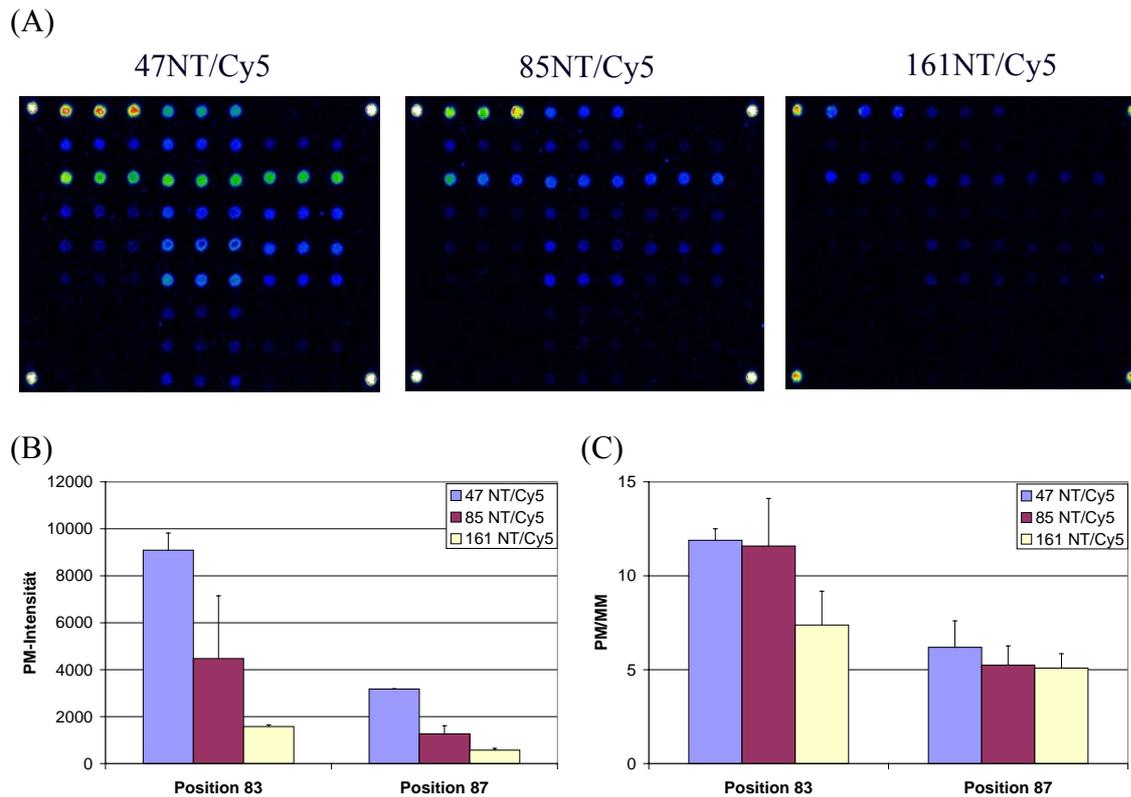
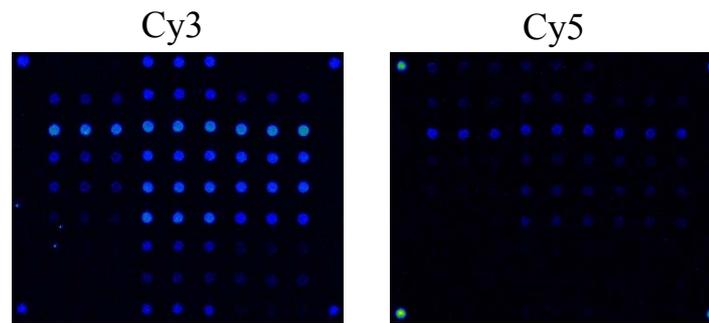


Abbildung 3.17: Der Einfluss der Einbaurate auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, n=9. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis.

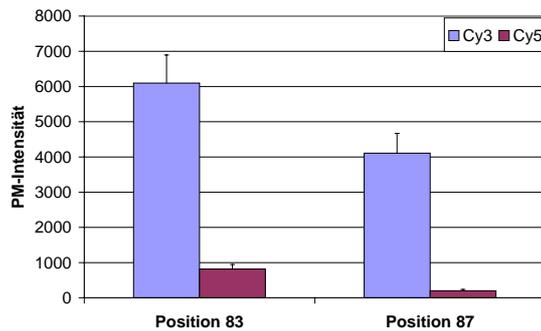
Art des Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffs

Sehr überraschend zeigte die Cy3-Markierung eine wesentlich höhere PM-Intensität im Vergleich zu der Cy5-Markierung unter der Verwendung von gleicher DNS-Menge mit ähnlicher Einbaurate (Abbildung 3.18). Der Unterschied im PM/MM-Verhältnis war nicht aussagekräftig. Für weitere Experimente wurde daher eine Cy3-Markierung verwendet.

(A)



(B)



(C)

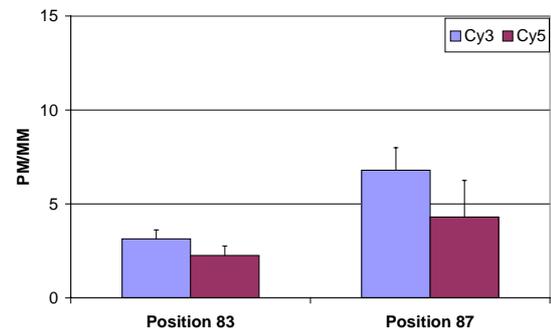


Abbildung 3.18: Der Einfluss des Typs des Cyaninfarbstoffs auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=9$. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis.

Menge der Ziel-DNS

Um die Wirkung unterschiedlicher Mengen von Ziel-DNS auf die Hybridisierung festzustellen, wurden 0.5 pmol bis 3 pmol Ziel-DNS unter Verwendung der oben optimierten Bedingungen für die Hybridisierung eingesetzt. Mit größerer Ziel-DNS Menge erhöhte sich die PM-Intensität, während das Verhältnis von PM/MM einigermaßen konstant bleibt (Abbildung 3.19). Mit 0.5 pmol Ziel-DNS lag die PM-Intensität von Position 87 schon unter dem *cut-off*-Wert von 300. Um die Sensitivität zu erhöhen wurde eine andere Hybridisierungsmethode eingesetzt, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

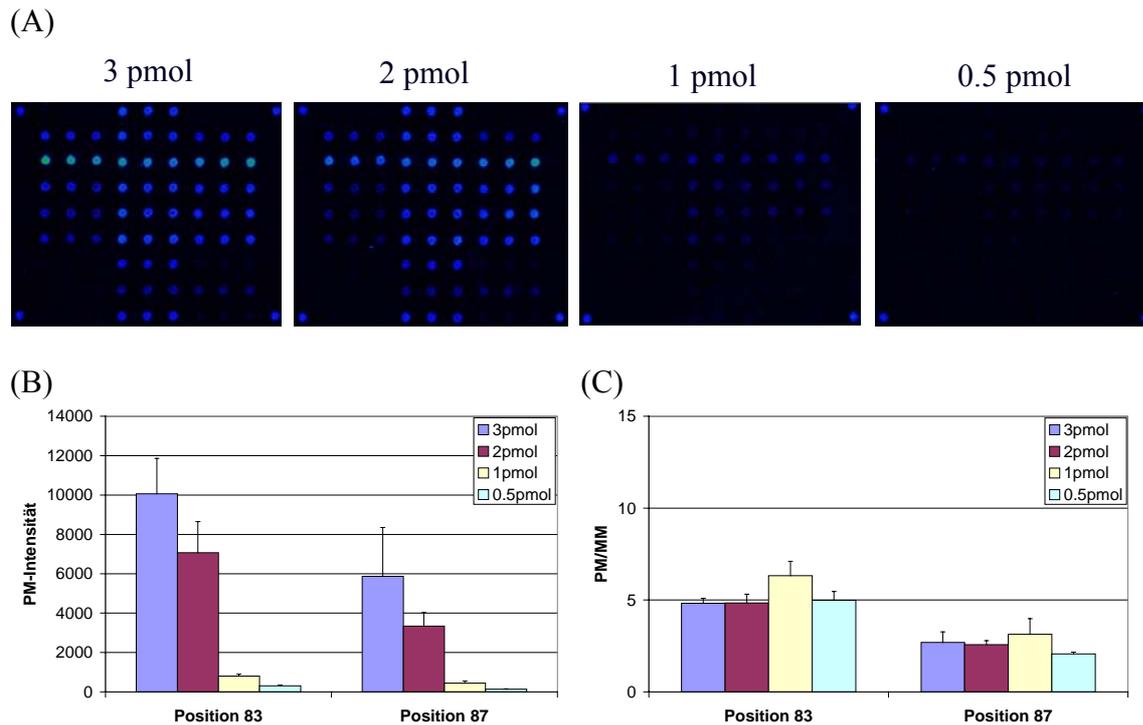


Abbildung 3.19: Der Einfluss der Menge der Ziel-DNS auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=9$. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis.

Nach Optimierung aller obenerwähnten Parameter wurde die Hybridisierungsbedingung festgelegt:

- Hybridisierungstemperatur: 45°C
- Hybridisierungszeit: 1 h
- Markierung der Ziel-DNS: Cy3
- Ziel-DNS: unverdaut, mit möglichst hoher Einbaurate.

3.1.4.3 Vergleich von verschiedenen Hybridisierungsmethoden

Die herkömmliche, statische Hybridisierungsmethode basiert auf Diffusion, die ein langsamer, passiver physikalischer Prozess ist. Daher ist die Hybridisierung der Zeitlimitierende Schritt im Mikroarray-Experiment. Da der Zeitfaktor eine wichtige Rolle in der klinischen Anwendung spielt, wurden andere Hybridisierungsmethoden untersucht, die eine aktive Bewegung der Flüssigkeit verwenden (wie z.B. Thermomixer-Hybridisierungs-Aufsatz und Tecan HS400). Das Ziel ist bei einer gleichbleibenden Sensitivität die Hybridisierungszeit zu reduzieren. Der Unterschied zwischen diesen zwei Ausrüstungen ist: Beim Thermomixer-Aufsatz wurden Objektträger zusammen mit der im Hybridisierungs-Rahmen eingeschlossenen Hybridisierungslösung geschüttelt. Das Waschen wurde manuell durchgeführt. Bei der Hybridisierungsstation von Tecan wurde nur die Flüssigkeit mittels eines Druck-Vakuum-Systems agitiert. Der ganze Prozess einschließlich der Waschstreps ist automatisiert.

Um unterschiedliche Methoden vergleichen zu können, wurden die Hybridisierungen mit unterschiedlicher Menge der Ziel-DNS (1, 0.5, 0.25 und 0.125 pmol) mittels Hybridisierungssofen (manuell), Tecan und Thermomixer durchgeführt.

Die Hybridisierungsdauer betrug eine Stunde. Ein Objektträger mit Triplikaten wurde für jede Bedingung verwendet und der Mittelwert von drei Spots wurde berechnet. Abbildung 3.20 zeigt das Ergebnis. Im Vergleich zur manuellen Hybridisierung wurde eine signifikante Zunahme der PM-Intensität für alle getesteten DNS-Mengen und für beide Positionen durch Verwendung der Tecan oder des Thermomixers erzielt (3A und 3C). Bei einer Ziel-DNS-Menge von 0.125 pmol, die mittels manueller Hybridisierung nicht detektiert werden konnte, zeigte die Verwendung der Tecan oder des Thermomixers ein Signal jeweils über 8000 bzw. 1000 für Position 83 bzw. 87. Außerdem ist die PM-Intensität unter Verwendung des Thermomixers höher als bei der Tecan HS400. Hinsichtlich des PM/MM-Wertes wurde ein wesentlich besseres Resultat mit der Tecan HS400 im Vergleich zur manuellen Hybridisierung und zum Thermomixer erreicht (3B und 3D). Deswegen wurde für Mischungsexperimente, bei der eine hohe Spezifität erforderlich war, die Tecan HS400 verwendet, und für die Sensitivitätstests, bei der die Sensitivität der wichtigste Faktor war, der Thermomixer-Aufsatz verwendet.

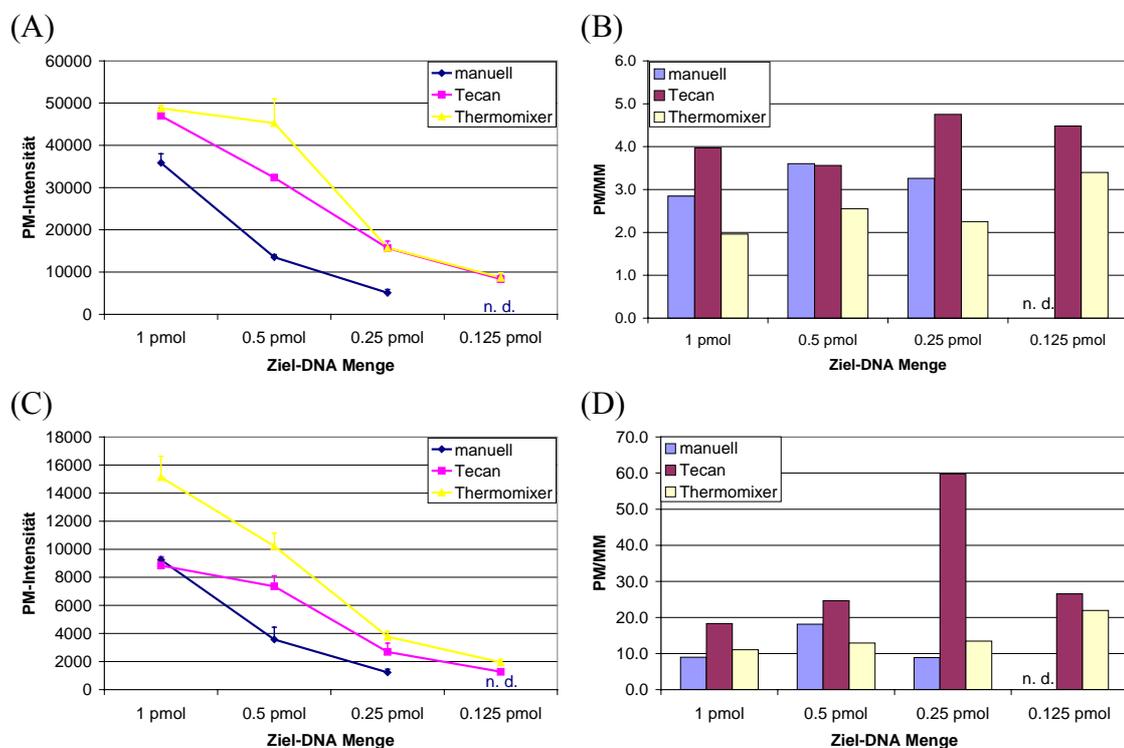


Abbildung 3.20: Der Einfluss unterschiedlicher Hybridisierungsmethoden auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=3$. A: Position 83, PM-Intensität; B: Position 83, PM/MM; C: Position 87 PM-Intensität; D: Position 87, PM/MM. (n. d.: nicht detektierbar)

3.1.5 Sensitivitätstest

Nachdem die optimalen Hybridisierungsbedingungen festgelegt wurden, wurde die Sensitivität des Mikroarrays mit unterschiedlicher Menge an Ziel-DNS (1, 0.5, 0.25 und 0.125 pmol) bei unterschiedlicher Hybridisierungszeit evaluiert (60 Minuten, 30 Minuten und 10 Minuten). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Die PM-Intensität verringerte sich mit abnehmender DNS-Menge und Hybridisierungszeit (A und C), während der PM/MM-Wert akzeptierbar (B und D) blieb. Überraschend

ermittelte sogar eine 10-minütige Hybridisierung mit einer DNS-Menge von 0.125 pmol eine PM-Intensität von 300 und einen PM/MM-Wert von 6.5 für Position 87, die in der Regel ein schwächeres Signal als Position 83 hatte.

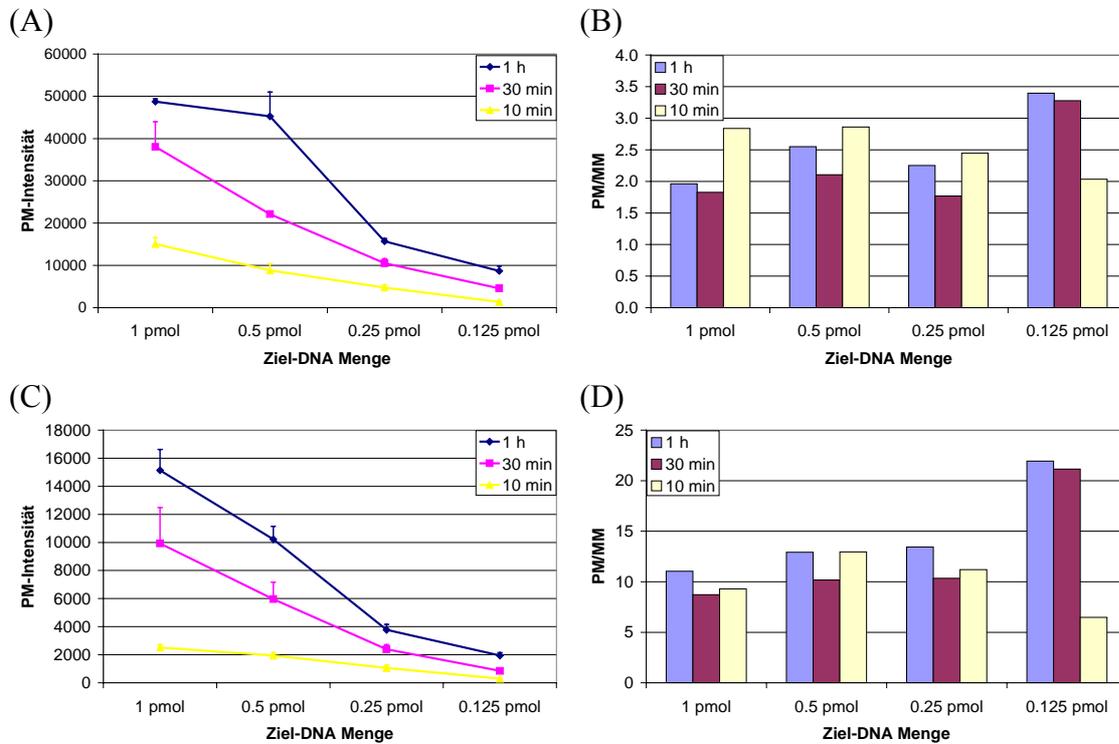


Abbildung 3.21: Mikroarray-Ergebnisse der Sensitivitätsbestimmung unter Verwendung verschiedener Hybridisierungszeiten (10, 30, 60 min) und Mengen der Ziel-DNS (0.125 - 1 pmol), n=3. A: Position 83, PM-Intensität; B: Position 83, PM/MM; C: Position 87, PM-Intensität; D: Position 87, PM/MM.

Aus Kostengründen wurden alle Sonden für den *gyrA*-Array ohne Poly-dT-Spacer entworfen. Vorhergehende Experimente mit PLL-Objektträger zeigten, dass die Verwendung von Poly-dT-Spacern am 5' Ende der Sonden die Fluoreszenzintensität des PM erheblich erhöhte. Wie in Abbildung 3.22 dargestellt, erzielten sechs dTs eine Signalzunahme des PM um das zweifache ohne eine beträchtliche Abnahme des PM/MM-Wert. Selbst mit 18 dTs war das Signal immer noch nicht gesättigt. Dadurch wurde gezeigt, dass die Sensitivität des Tests weiter erhöht werden kann, wenn Poly-dT-Spacer benutzt werden.

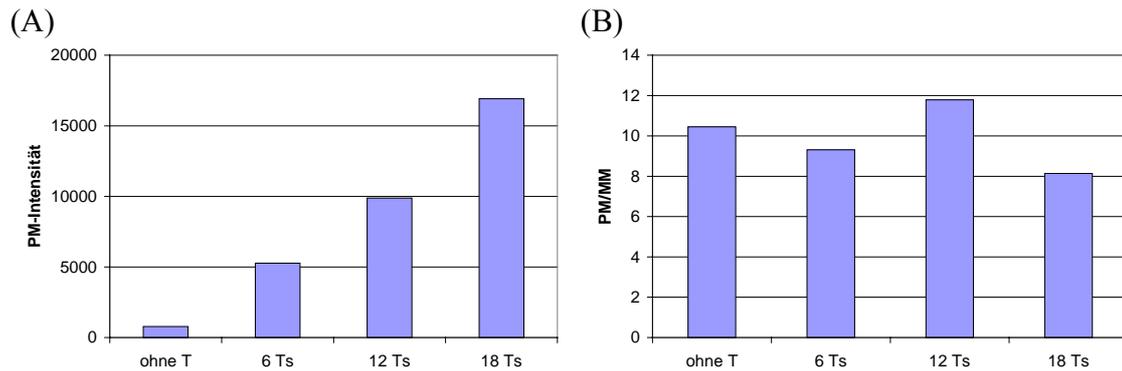


Abbildung 3.22: Der Einfluss der Länge von Poly-dT-Spacern auf die PM-Intensität (A) und das PM/MM-Verhältnis (B), n=3

3.1.6 Untersuchung von Mischproben

Bei einer realen Situation in der Klinik tritt häufig die Koexistenz von sensitiven und resistenten *E. coli* innerhalb einer Patientenprobe auf. Um diese Situation zu simulieren, wurde 140 ng genomische DNS eines sensitiven *E. coli* mit unterschiedlichem Anteil an genomischer DNS von einem resistenten *E. coli* gemischt (1:0, 100:1, 10:, 1:1 und 0:1). Die Mischung wurde als Template für die PCR benutzt. Zu untersuchen war, wie hoch das Potential ist, resistente *E. coli* in Anwesenheit des Überschusses von sensitiven *E. coli* mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Mikroarray-System zu detektieren. Für diese Untersuchung wurde für jede Bedingung 1 pmol Ziel-DNS und eine Stunde Hybridisierungszeit verwendet. Eine Dreifach-Bestimmung mit drei Objektträgern wurde durchgeführt. Wegen der unterschiedlichen Einbauraten der amplifizierten Ziel-DNS, konnten die Fluoreszenzintensitäten nicht direkt miteinander verglichen werden. Um die Intensitäten vergleichbar zu machen, wurden zwei Normierungsverfahren ausgewählt. In Methode 1 wurde die absolute Intensität jeder Sonde gegen die absolute Intensität der Prozess-Kontrolle-Sonde normiert. Der normierte Wert wurde relative Intensität 1 genannt. In Methode 2 wurde die absolute Intensität der resistenten Sonde (MM-Sonde in diesem Fall) gegen die absolute Intensität der sensitiven Sonde (PM-Sonde in dem Fall) normiert. Relative Intensität 2 wurde dieser normierte Wert genannt.

Mit erhöhtem Anteil der DNS von resistentem *E. coli* in der Mischung erhöhte sich die Fluoreszenzintensität der resistenten Sonde (Asn), während die Fluoreszenzintensität der sensitiven Sonde (Asp) sich verringerte (Abbildung 3.23). In Abbildung 3.23B ist diese Tendenz graphisch wiedergegeben. In Abbildung 3.23C wurde die Intensität der sensitiven Sonde auf 100 aufgesetzt, somit war die Korrelation zwischen der relativen Intensität 2 der resistenten Probe und ihrem Anteil in der Mischung noch deutlicher. Unterhalb des Mischverhältnisses von 10:1 gab es kein nachweisbares Signal für resistentes *E. coli*. Mit einem Verhältnis von 1:1 wurde kein signifikantes Signal für resistentes *E. coli* detektiert. Die Nachweisgrenze lag zwischen 1:1 bis 10:1.

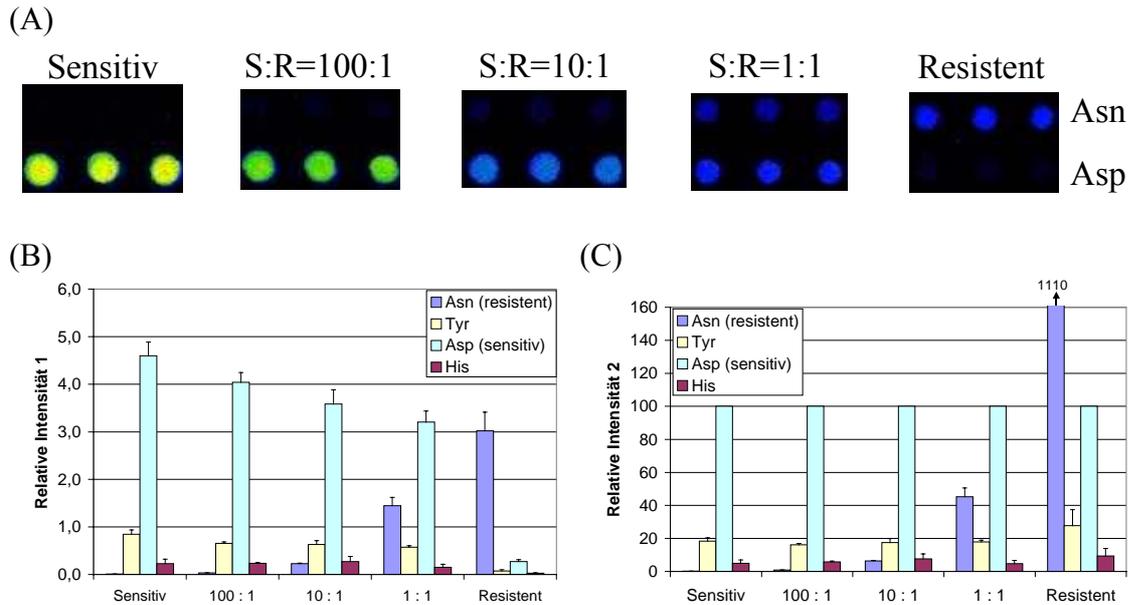


Abbildung 3.23: Mikroarray-Ergebnisse der DNS-Mischung aus einem sensitiven und einem resistenten *E. coli* in unterschiedlichen Mischverhältnissen (1:0, 100:1, 10:1, 1:1 und 0:1), n=9. A: Fluoreszenz-Bilder (Nur die sensitiven und resistenten Sonden sind hier gezeigt.); B: relative Intensität 1, Position 87; C: relative Intensität 2, Position 87.

3.1.7 Untersuchung von aufgestockten Realproben mit *E. coli* in verschiedenen Verdünnungsstufen

Anhand aufgestockter Urinproben mit unterschiedlichen Mengen von *E. coli* (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 CFU/ml) wurde die Sensitivität des gesamten Systems einschließlich der DNS-Extraktion und der Markierungs-PCR evaluiert. 10000, 1000, 100, 10 und 1 CFU wurden jeweils für die PCR verwendet. Die gleiche Menge des Amplikons wurde für die Agarosegelfärbung mittels Ethidiumbromid und Mikroarray-Detektion mit einer Stunde Hybridisierungszeit benutzt. Ein Objektträger pro Experiment wurde hierbei verwendet. Um ein zuverlässiges Ergebnis zu erhalten, wurden sechs Isolate (*E. coli* 31 - 36) für diesen Test verwendet. Das Mikroarray-Resultat von einem dieser sechs Isolate (*E. coli* 36) wird in Abbildung 3.24A – B gezeigt. Trotz der Abnahme der PM-Intensität für die beiden Positionen mit der verringerten Menge von *E. coli* in Urin konnte die Resistenz von *E. coli* in einer Konzentration von 100 CFU/ml mit einer ausreichenden PM-Intensität und einem PM/MM-Verhältnis ermittelt werden. Alle getesteten sechs Isolate zeigten ein ähnliches Verhalten (Abbildung 3.24 C - H). Die PM-Intensitäten (Abbildung 3.24 C und D) waren über dem *cut-off*-Wert von 300 und die PM/MM-Verhältnisse (Abbildung 3.24 E und F) waren über dem *cut-off*-Wert von 1.5 für alle untersuchten Isolate und für alle Verdünnungsreihen. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Resistenz aller dieser sechs Isolate bis zu 100 CFU/ml ermittelt werden konnte. Außerdem konnte der korrekte Genotyp identifiziert werden (Abbildung 3.23 G und H). Das Verhältnis zwischen der gesamten Intensität der Sonden für Genotyp 1 und Genotyp 2 war mindestens 1.3 bzw. 15 für Position 83 bzw. Position 87. Die Mikroarray-Daten sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Das Ergebnis der parallel durchgeführten Sequenzierung bestätigte das Mikroarray-Ergebnis.

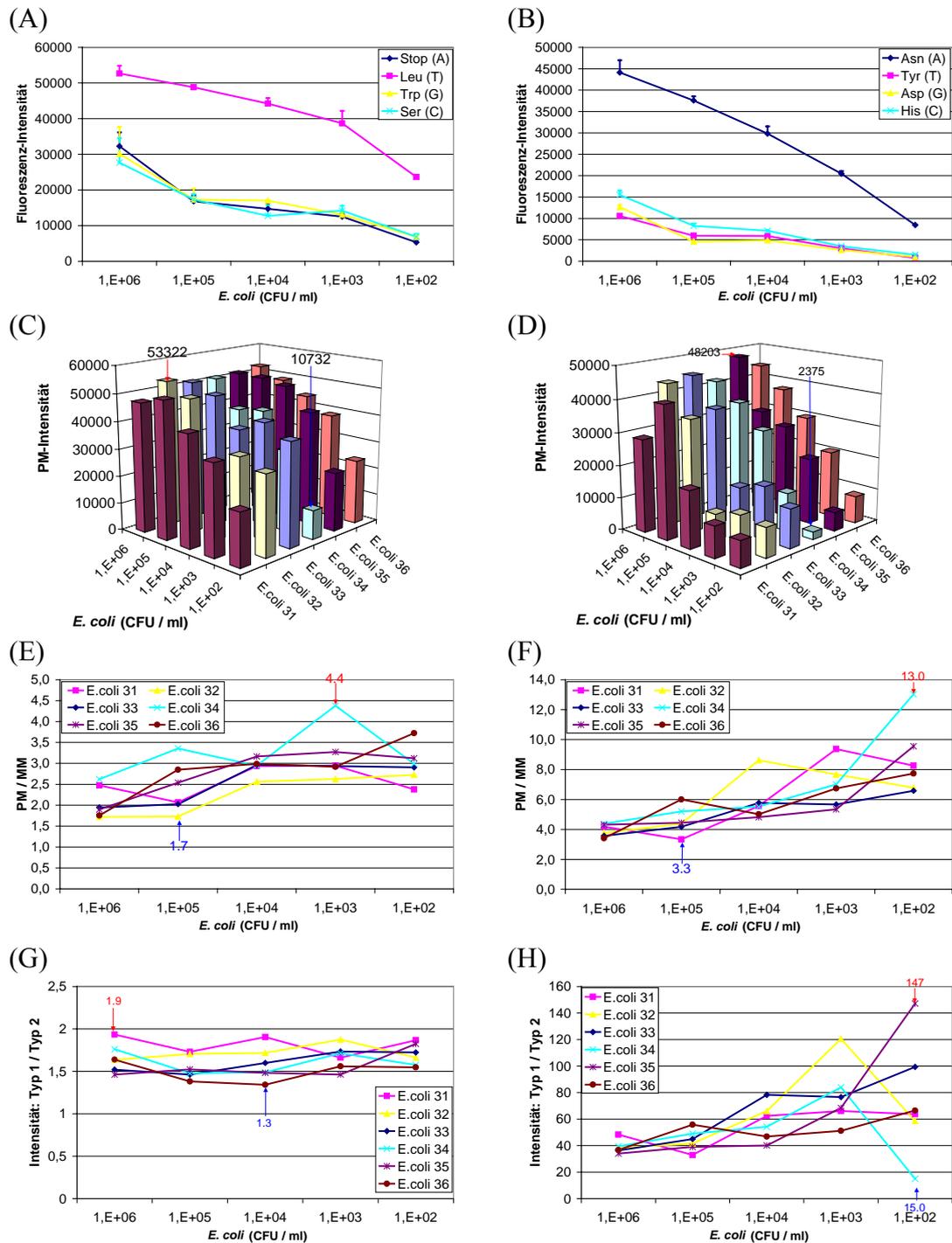


Abbildung 3.24: Mikroarray-Ergebnisse der aufgestockten Urinproben mit *E. coli* Isolates in verschiedenen Verdünnungsstufen, n=3. A: Position 83, Fluoreszenz-Intensität eines Isolats (*E. coli* 36); B: Position 87, Position 83, Fluoreszenz-Intensität eines Isolats (*E. coli* 36); C: Position 83, PM-Intensität aller sechs getesteten Isolate; D: Position 87, PM/MM aller sechs getesteten Isolate; E: Position 83, PM/MM aller sechs getesteten Isolate; F: Position 87, PM/MM aller sechs getesteten Isolate; G: Position 83, Intensität: Genotyp1/Genotyp2; H: Position 87, Intensität: Genotyp1/Genotyp2. (Der rote und blaue Pfeil zeigt jeweils den höchsten und niedrigsten Wert.)

Tabelle 3.6: Mikroarray-Daten der aufgestockten Urinproben

	absolute Intensität	MM (relative Intensität 2)				PM/MM	Type1/Type2
		A	T	G	C		
Position 83	> 10732	< 61.6%	-	< 61.5%	< 13.0%	> 1.7	> 1.3
Position 87	> 2375	-	< 24.6%	< 30.0%	< 36.0%	> 3.3	> 15.0

Im Vergleich zum Mikroarray-Ergebnis war die Nachweisgrenze der Ethidiumbromid-Färbung (Tabelle 3.7) von vier Isolaten 100fach höher (10000 CFU/ml) bzw. von einem Isolat 10fach höher (1000 CFU/ml) als die des Mikroarrays. Sowohl die Ethidiumbromid-Färbung als auch das Mikroarray-Ergebnis zeigten kein Signal der negativen Kontrolle an.

Tabelle 3.7: Detektionsgrenze des *gyrA*-Arrays für sechs *E. coli* Isolate, aufgestockt in verschiedenen Verdünnungsstufen (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 CFU/ml) in Urin

Nummer	CFU / ml	Gel	Mikroarray
<i>E. coli</i> 31	10^6	+	+
	10^5	+	+
	10^4	+	+
	10^3	-	+
	10^2	-	+
<i>E. coli</i> 32	10^6	+	+
	10^5	+	+
	10^4	+	+
	10^3	+	+
	10^2	+	+
<i>E. coli</i> 33	10^6	+	+
	10^5	+	+
	10^4	+	+
	10^3	+	+
	10^2	-	+
<i>E. coli</i> 34	10^6	+	+
	10^5	+	+
	10^4	+	+
	10^3	-	+
	10^2	-	+
<i>E. coli</i> 35	10^6	+	+
	10^5	+	+
	10^4	+	+
	10^3	-	+
	10^2	-	+
<i>E. coli</i> 36	10^6	+	+
	10^5	+	+
	10^4	+	+
	10^3	-	+
	10^2	-	+
Negative		-	-

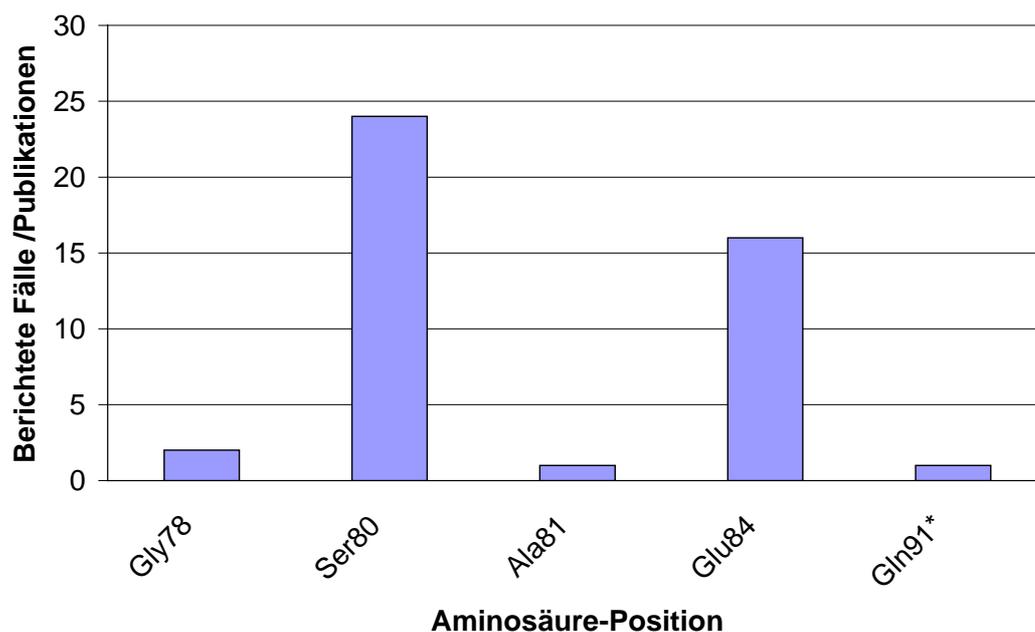


Abbildung 3.26: Publierte Fälle von Chinolon-Resistenz in Abhängigkeit von verschiedenen *parC* Mutationen. (Literaturanalyse von Januar 1985 bis Juni 2003 in PubMed. Positionen mit stillen Mutationen sind mit einem Stern gekennzeichnet.)

Tabelle 3.8: Publierte Mutationen in der *parC* QRDR Sequenz von verschiedenen *E. coli* Stämmen. Die unterstrichenen Nukleotide kennzeichnen den Nukleotidaustausch im Vergleich zum *E. coli* K12 (accession Nummer M58408 in GenBank). Die Aminosäure-Substitutionen sind unter dem entsprechenden Nukleotid gezeigt. (Literaturanalyse von Januar 1985 bis Juni 2003 in PubMed)

Aminosäure Position	78	80	81	84	91
<i>E. coli</i> K12	GGC <i>Gly</i>	AGC <i>Ser</i>	GCC <i>Ala</i>	GAA <i>Glu</i>	CAA <i>Gln</i>
	<u>G</u> AC <i>Asp</i>	<u>C</u> GC <i>Arg</i>		<u>A</u> AA <i>Lys</i>	<u>C</u> AG
		<u>A</u> GA <i>Arg</i>		<u>G</u> GA <i>Gly</i>	
		<u>A</u> TC <i>Ile</i>		<u>G</u> TA <i>Val</i>	
		<u>A</u> GT <i>Ser</i>			
		<u>A</u> TT <i>Ile</i>			

Alle Positionen, die eine *missense* Mutation oder eine stille Mutation enthalten, wurden aufgrund der Anzahl der Veröffentlichung und deren Beitrag zur Resistenz

ausgewertet. Die erste und zweite Base des Triplets der Position 80 und 84 stellten sich als die zuverlässigsten zur Identifizierung der Chinolon-Resistenz heraus. Daher wurden diese zwei Positionen als Zielbereich der Sonden ausgewählt. Obwohl Mutationen an mehreren Positionen innerhalb eines Triplets stattfinden können, ist ein gleichzeitiges Auftreten mehrerer Mutationen innerhalb eines Triplets eher selten. Daher hatten alle Sonden an den zwei nicht-SNP-Positionen eines Triplets die gleichen Basen wie der Wildtyp (*E. coli* K12). Wegen der stillen Mutationen in der Nähe von *missense* Mutationen (Position 77, 79 und 87), wurden vier SONDENSÄTZE für Position 80 (32 Sonden) und zwei SONDENSÄTZE für 84 (16 Sonden) entworfen. Die Hälfte der Sonden dient zur Detektion der ersten Base im Triplet, die andere Hälfte der Detektion der zweiten Base. Der Vollständigkeit halber wurden auch Sonden für die letzte Base von Position 80 entworfen, die selten mutiert ist. Die SONDENSEQUENZEN und deren Eigenschaften sind in Tabelle 3.9 aufgelistet. Die Sonden wurden nach folgender Regel bezeichnet: SONDENAME = GENNAME + POSITION + BASE AN SNP-POSITION + SATZNUMMER. Alle Sonden haben eine Länge von 19 Basen, einen T_m-Wert zwischen 49°C und 58°C und tragen am 5' Ende einen Poly-dT-Abstandhalter von 14 Basen und eine C6-Aminomodifikation. Die variierende Base zur SNP-Detektion liegt in der Mitte.

Tabelle 3.9: Auf Position 80 und 84 von *E. coli parC* gerichtete ASOH-Sonden unter der Berücksichtigung von stillen Mutation an Position 77, 79, 80 und 82. Die fett gedruckten Buchstaben kennzeichnen die Nukleotidpositionen mit *missense* Mutationen und die unterstrichenen Buchstaben kennzeichnen die Nukleotidpositionen mit stillen Mutationen.

Name	Position	Genotyp	stille Mutation	Sequenz (5' → 3') *	Aminosäure	GC %	T _m ** °C	Hairpin kcal/mol ***	Dimer kcal/mol ***
ParC80A1	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-C)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AG</u> CGCCTG <u>I</u> TA	Ser	58	53	-4,7	-5,1
ParC80T1	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-C)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>TG</u> CGCCTG <u>I</u> TA	Cys	58	53	-4,7	-5,1
ParC80G1	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-C)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>GG</u> CGCCTG <u>I</u> TA	Gly	63	55	-4,7	-8,9
ParC80C1	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-C)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>CG</u> CGCCTG <u>I</u> TA	Arg	63	55	-4,7	-11,2
ParC80A2	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-C)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AA</u> CGCCTG <u>I</u> TA	Asn	53	51	-4,7	-4,7
ParC80T2	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-C)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AT</u> CGCCTG <u>I</u> TA	Ile	53	51	-4,7	-16,6
ParC80G2	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-C)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AG</u> CGCCTG <u>I</u> TA	Ser	58	53	-4,7	-5,1
ParC80C2	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-C)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AC</u> CGCCTG <u>I</u> TA	Thr	58	53	-4,7	-4,7
ParC80A3	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-T)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AG</u> GCCTG <u>I</u> TA	Ser	53	51	-2,4	-2,4
ParC80T3	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-T)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>TG</u> GCCTG <u>I</u> TA	Cys	53	51	-2,4	-2,4
ParC80G3	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-T)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>GG</u> GCCTG <u>I</u> TA	Gly	58	53	-2,4	-2,4
ParC80C3	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-T)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>CG</u> GCCTG <u>I</u> TA	Arg	58	53	-2,4	-6,5
ParC80A4	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-T)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AA</u> IGCCTG <u>I</u> TA	Asn	47	49	-2,4	-2,4
ParC80T4	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-T)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AT</u> IGCCTG <u>I</u> TA	Ile	47	49	-2,4	-2,4
ParC80G4	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-T)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AG</u> IGCCTG <u>I</u> TA	Ser	53	51	-2,4	-2,4
ParC80C4	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/80(-T)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AC</u> IGCCTG <u>I</u> TA	Thr	53	51	-2,4	-2,4
ParC80A5	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AG</u> AGCCTG <u>I</u> TA	Arg	53	51	-2,4	-2,4
ParC80T5	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AG</u> TGCCTG <u>I</u> TA	Ser	53	51	-2,4	-2,4
ParC80G5	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/82(TGT)	ACGGCGAT <u>AG</u> GGCCTG <u>I</u> TA	Arg	58	53	-2,4	-4,3

Tabelle 3.9 Fortsetzung

Name	Position	Genotyp	stille Mutation	Sequenz (5' → 3') *	Aminosäure	GC %	Tm ** °C	Hairpin kcal/mol ***	Dimer kcal/mol ***
ParC80C5	80	1	77(CAC) / 79(GAT)/82(TGT)	ACGGCGATAGCGCCTGTTA	Ser	58	53	-4,7	-5,1
ParC80A6	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--C)/82(TGC)	ATGGCGACAGCGCCTGCTA	Ser	63	55	-4,7	-5,1
ParC80T6	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--C)/82(TGC)	ATGGCGAC ^C TGCGCCTGCTA	Cys	63	55	-4,7	-5,1
ParC80G6	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--C)/82(TGC)	ATGGCGACGGCGCCTGCTA	Gly	68	58	-4,7	-8,9
ParC80C6	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--C)/82(TGC)	ATGGCGACCGCGCCTGCTA	Arg	68	58	-4,7	-5,1
ParC80A7	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--C)/82(TGC)	ATGGCGACAACGCCTGCTA	Asn	58	53	-4,7	-4,7
ParC80T7	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--C)/82(TGC)	ATGGCGACATCGCCTGCTA	Ile	58	53	-4,7	-6,0
ParC80G7	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--C)/82(TGC)	ATGGCGACAGCGCCTGCTA	Ser	63	55	-4,7	-5,1
ParC80C7	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--C)/82(TGC)	ATGGCGACACCGCCTGCTA	Thr	63	55	-4,7	-4,7
ParC80A8	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--T)/82(TGC)	ATGGCGACAGTGCCTGCTA	Ser	58	53	-2,4	-2,4
ParC80T8	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--T)/82(TGC)	AIGGCGAC ^C TGIGCCTGCTA	Cys	58	53	-2,4	-2,4
ParC80G8	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--T)/82(TGC)	AIGGCGACGGTGCCTGCTA	Gly	63	55	-2,4	-2,4
ParC80C8	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--T)/82(TGC)	AIGGCGACCGTGCCTGCTA	Arg	63	55	-2,4	-2,4
ParC80A9	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--T)/82(TGC)	AIGGCGACAAATGCCTGCTA	Asn	53	51	-2,4	-2,4
ParC80T9	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--T)/82(TGC)	AIGGCGACATIGCCTGCTA	Ile	53	51	-2,4	-2,4
ParC80G9	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--T)/82(TGC)	AIGGCGACAGTGCCTGCTA	Ser	58	53	-2,4	-2,4
ParC80C9	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/80(--T)/82(TGC)	AIGGCGACACTGCCTGCTA	Thr	58	53	-2,4	-2,4
ParC80A10	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/82(TGC)	AIGGCGACAGAGCCTGCTA	Arg	58	53	-2,4	-2,4
ParC80T10	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/82(TGC)	AIGGCGACAGTGCCTGCTA	Ser	58	53	-2,4	-2,4
ParC80G10	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/82(TGC)	AIGGCGACAGGGCCTGCTA	Arg	63	55	-2,4	-4,3
ParC80C10	80	2	77(CAT) / 79(GAC)/82(TGC)	AIGGCGACAGCGCCTGCTA	Ser	63	55	-4,7	-5,1
ParC84A1	84	1	82(TGT)	CCTGTTATAAAGCGATGGT	Lys	42	47	0,0	-2,4
ParC84T1	84	1	82(TGT)	CCTGTTATTAAGCGATGGT	Stop	42	47	0,0	-0,7
ParC84G1	84	1	82(TGT)	CCTGTTATGAAGCGATGGT	Glu	47	49	0,0	0,0
ParC84C1	84	1	82(TGT)	CCTGTTATCAAGCGATGGT	Gln	47	49	-0,3	-0,3
ParC84A2	84	1	82(TGT)	CCTGTTATGAAGCGATGGT	Glu	47	49	0,0	0,0
ParC84T2	84	1	82(TGT)	CCTGTTATGTAGCGATGGT	Val	47	49	0,0	0,0
ParC84G2	84	1	82(TGT)	CCTGTTATGGAGCGATGGT	Gly	53	51	0,0	0,0
ParC84C2	84	1	82(TGT)	CCTGTTATGCAGCGATGGT	Ala	53	51	0,0	-3,3
ParC84A3	84	2	82(TGC)	CCTGCTATAAAGCGATGGT	Lys	47	49	-1,7	-1,7
ParC84T3	84	2	82(TGC)	CCTGCTATTAAGCGATGGT	Stop	47	49	-1,7	-1,7
ParC84G3	84	2	82(TGC)	CCTGCTATGAAGCGATGGT	Glu	53	51	-1,7	-1,7
ParC84C3	84	2	82(TGC)	CCTGCTATCAAGCGATGGT	Gln	53	51	-1,7	-1,7
ParC84A4	84	2	82(TGC)	CCTGCTATGAAGCGATGGT	Glu	53	51	-1,7	-1,7
ParC84T4	84	2	82(TGC)	CCTGCTATGTAGCGATGGT	Val	53	51	-1,7	-2,4
ParC84G4	84	2	82(TGC)	CCTGCTATGGAGCGATGGT	Gly	58	53	-1,7	-1,7
ParC84C4	84	2	82(TGC)	CCTGCTATGCAGCGATGGT	Ala	58	53	-1,7	-3,3

* Alle Sonden tragen am 5' Ende einen Poly-dT-Abstandhalter von 14 Basen und eine C6-Aminomodifikation, die hier nicht dargestellt sind.

** Tm wurde berechnet mittels OligoCalculator (<http://trishul.sci.gu.edu.au/tools/OligoCalculator.html>) unter Verwendung von 0.195M Salzkonzentration (1x SSC).

*** ΔG der Sekundärstrukturen wurde berechnet mit Hilfe von Software Array Designer, dessen Kalkulation auf der Methode von SantaLucia basiert⁷⁴

3.2.1.2 Mikroarray-Ergebnisse

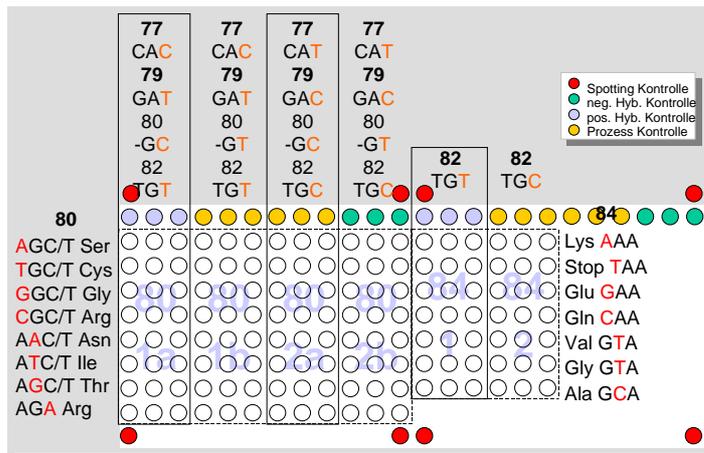
Der gesamte Assay soll den *gyrA*- und den *parC*-Array enthalten. Daher wurde die für den *gyrA*-Array verwendete ASOH-Methode zunächst auch für den *parC*-Array eingesetzt, um die Vereinigung beider Arrays zu ermöglichen. Es wurden jedoch extrem starke Sekundärstrukturen in dem Sequenzbereich gefunden, in der die ASOH Sonden lokalisiert sind. Nach der Berechnung des Array Designer Programmes waren die ΔG -Werte für *hairpin* und Dimer von fast der Hälfte der Sonden kleiner als -3 kcal/mol (Tabelle 3.9). Nach den Kriterien von Array Designer wurde die Sonde, die einen ΔG -Wert kleiner als -3 kcal/mol besitzt, eine schlechte Hybridisierungsfähigkeit zugeschrieben.

Die experimentellen Daten bestätigten die theoretische Berechnung. Bei manchen PM-Sonden, die einen stark negativen ΔG -Wert hatten, wurde kein Signal oder nur ein schwaches Signal festgestellt. Daher konnte in einigen Fällen das PM nicht korrekt identifiziert werden. Abbildung 3.27B zeigt ein solches Beispiel. Laut Sequenzierung befand sich bei diesem Isolat (*E. coli* 5, Genotyp 1) an Position 80 Ile. Aber mittels Mikroarrays wurde Gly als PM identifiziert. Die Ursache für die falsche Identifizierung lag an der extrem stabilen Sekundärstruktur der PM-Sonde (*E.coli*_ParC80T2), die einem ΔG -Wert des Dimers von -16.6 kcal/mol entsprach. Die MM-Sonde hatte dagegen einen ΔG -Wert von nur -8.9 kcal/mol, obwohl sich die beiden Sonden nur in einer einzigen Base unterschieden. Sowohl die Sekundärstruktur als auch die MM-Base störte die Hybridisierung. In diesem Fall ist die störende Wirkung der Sekundärstruktur der PM-Sonde größer als die destabilisierende Wirkung der MM-Base der MM-Sonde. Daher zeigte die MM-Sonde ein höheres Signal als die PM-Sonde.

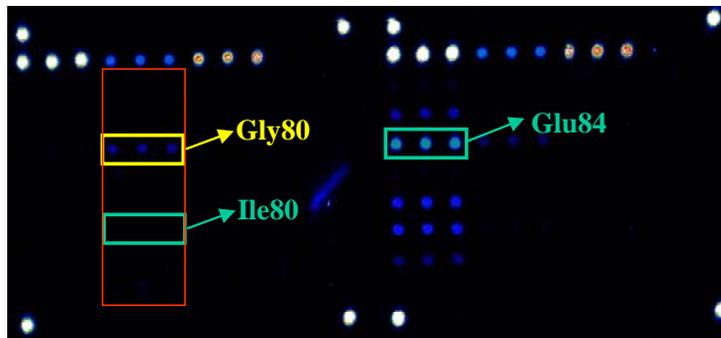
Erstaunlicherweise wurde ein anderes Isolat (*E. coli* 10, Genotyp 2) mit derselben Mutation in Position 80 mit der PM-Sonde (*E.coli*_ParC80T7) richtig identifiziert (Abbildung 3.27C). Allerdings gehört dieses Isolat zum Genotyp 2 statt Genotyp 1. Der Unterschied zwischen den beiden PM-Sonden lag an der zweiten und achten Base vom 5' Ende, die auf die stillen Mutationen gerichtet waren. Die Unterschiedlichkeit der stille-Mutations-Position führte hierbei zu einem Unterschied des ΔG -Werts der Dimere von 11.9 kcal/mol (Abbildung 3.28). Die Sekundärstruktur der PM-Sonde *E.coli*_ParC80T7 (-4.7 kcal/mol) ist nicht so stabil wie die der PM-Sonde *E.coli*_ParC80T2 (-16.6 kcal/mol). Daher kann die Ziel-DNS noch binden und ein deutlich höheres PM-Signal gegenüber dem MM-Signal erreicht werden.

Um das Problem der Sekundärstruktur zu lösen, wurden folgende Bedingungen getestet: Sonden von verschiedenen Herstellern, Sonden mit oder ohne Abstandhalter, Sonden mit oder ohne Modifikation, Sonden gerichtet auf den *sense* Strang oder *antisense* Strang, Sonden in verschiedenen Konzentrationen von $5 \mu\text{m}$ bis $40 \mu\text{m}$ und Vorverhandlung der Ziel-DNS mit oder ohne Denaturierung. Leider zeigte keine dieser Strategien eine Aussicht auf Erfolg. Da wegen der Lage der Mutationspositionen kein anderes Sondendesign möglich war, musste eine andere Methode verwendet werden, die einen anderen Bereich für das Sondendesign nutzt. (siehe Abschnitt 3.2.2).

(A)



(B)



(C)

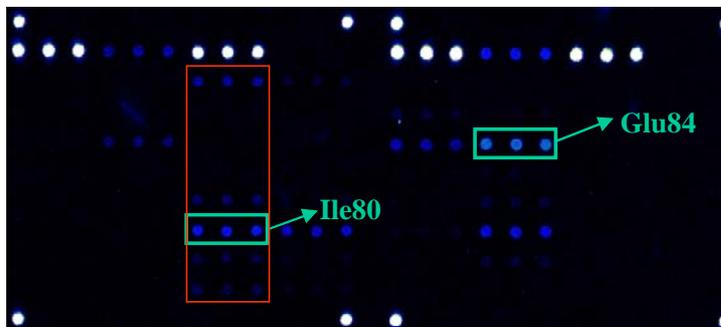


Abbildung 3.27: Mikroarray-Ergebnisse (ASOH Methode) von zwei klinischen *E. coli* Isolaten nach 18 Stunden Hybridisierung mit 4 pmol Ziel-DNS. A: Mikroarray-Layout; B: Fluoreszenz-Bilder von einem resistenten *E. coli* (*E. coli* 5), Genotyp 1; C: Fluoreszenz-Bilder von einem resistenten *E. coli* (*E. coli* 10), Genotyp 2. Der rote Rahmen zeigt den korrekten Genotyp, der grüne Rahmen zeigt den Soll-PM-Spot und der gelbe Rahmen zeigt den falschen PM-Spot.

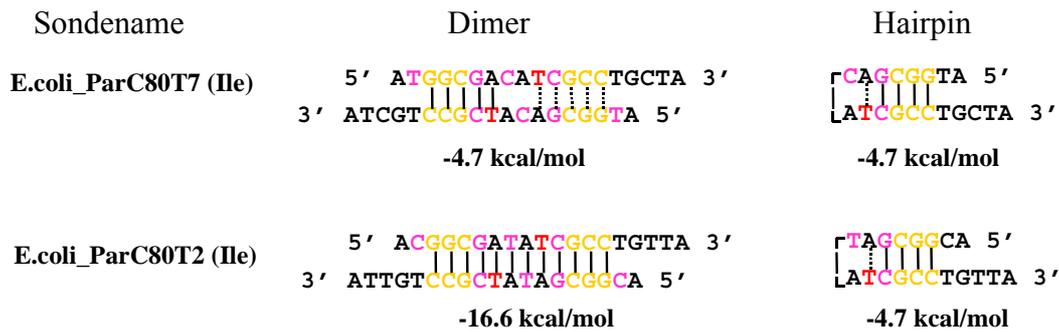


Abbildung 3.28: Sekundärstrukturen der zwei auf Position 80 von *E. coli parC* gerichteten Sonden für ASOH (E.coli_ParC80T2 für Genotyp 1 und E.coli_ParC80T7 für Genotyp 2). Nukleotide sind rot markiert, wenn sie sich an *missense*-Mutations-Positionen befinden. Nukleotide sind rosa markiert, wenn sie an stille-Mutations-Positionen lokalisiert sind. Nukleotide sind gelb markiert, wenn sie Sekundärstrukturen in allen Probesätzen bilden.

3.2.2 allele-specific primer extension Methode

3.2.2.1 Sondendesign

Als Alternative zur ASOH Methode, wurde die ASPE Methode für den *parC*-Array eingesetzt. Da die variierende Base der ASPE-Sonde am 3'-Ende statt in der Mitte liegt, war es möglich, einen anderen Sequenzteil für das Sondendesign zu nutzen. Dadurch konnte das Problem der Sekundärstruktur umgangen werden. Dennoch gab es immer noch gewisse Sekundärstrukturen in einigen ASPE-Sonden, insbesondere in denen, die auf Position 80 gerichtet waren. Diese Sekundärstrukturen waren jedoch nicht so stabil wie die der entsprechenden ASOH-Sonden. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 3.29 dargestellt. Die beiden Sonden zielten auf die gleiche Mutation. Der ΔG -Wert der ASOH-Sonde (E.coliParC80T2) betrug -16.6 kcal/mol, während der ΔG -Wert der ASPE-Sonde (E.coliParC80T2_PE) nur -2.8 kcal/mol betrug.

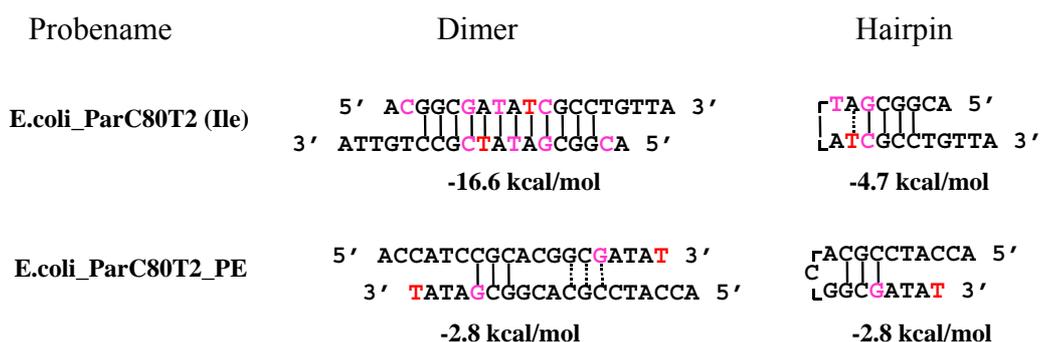


Abbildung 3.29: Sekundärstrukturen einer auf Position 80 von *E. coli parC* gerichteten ASOH-Sonde (E.coli_ParC80T2) und ASPE-Sonde (E.coli_ParC80T2_PE). Nukleotide sind rot markiert, wenn sie sich an *missense*-Mutations-Positionen befinden. Nukleotide sind rosa markiert, wenn sie an stille-Mutations-Positionen lokalisiert sind.

Insgesamt wurden 40 spezifische und 20 universelle Sonden für die zwei wichtigsten *missense*-Mutations-Positionen (Position 80 und 84) entworfen. Aufgrund der Stamm-spezifischen stillen Mutationen in Position 77, 79 und 87 wurden jeweils

zwei spezifische Probensätze für Position 80 (24 Sonden) und Position 84 (16 Sonden) benötigt. Sonden für Position 84 waren auf den *antisense* Strang statt auf den *sense* Strang gerichtet, weil weniger stille Mutationen (eine statt drei) in diesem Sondenbereich lokalisiert waren. Daher konnte die Anzahl der Sonden reduziert werden. Aus dem gleichen Grund wie bei dem *gyrA*-Array wurden auch hier universelle Sonden entworfen, die in stille-Mutations-Positionen Inosin besaßen. Die Sonden für Position 80 waren auf alle drei Basen dieses Triplets gerichtet, die Sonden für Position 84 nur auf die ersten zwei Basen. Die Sondensequenzen und deren Eigenschaften sind in Tabelle 3.10 aufgelistet. Die Sonden wurden nach folgender Regelung benannt: Sondenname = Genname + Position + Base an SNP-Position + Satznummer + Strand (*sense* oder *antisense*) + PE (Primer Extension). Alle Sonden haben eine Länge von 19 Basen, einen Tm-Wert zwischen 53°C und 58°C und tragen am 5' Ende ein Poly-dT-Abstandhalter von 14 Basen und eine C6-Aminomodifikation. Die variierende Base befindet sich am 3' Ende.

Tabelle 3.10: ASPE-Sonden gerichtet auf Position 80 und 84 von *E. coli parC* unter der Berücksichtigung von stillen Mutationen in Position 77 und 87. Die fett gedruckten Buchstaben kennzeichnen die Nukleotidpositionen mit *missense* Mutationen und die unterstrichenen Buchstaben kennzeichnen die Nukleotidpositionen mit stillen Mutationen. Die universellen Sonden enthielten Inosin, daher konnten Tm und frei Energie (ΔG) der Sekundärstrukturen nicht berechnet werden.

Name	AS Position	Basen Position	Genotyp	stille Mutation	Sequenz (5' → 3') *	GC %	Tm ** °C	Hairpin kcal/mol ***	Dimer kcal/mol ***
PE_ParC80A1_PE	80	1	1	77(CAC) / 79(GAT)	TACCATCCGCAC <u>GGCGATA</u>	58	53	-2,8	-2,8
PE_ParC80T1_PE	80	1	1	77(CAC) / 79(GAT)	TACCATCCGCAC <u>GGCGGAT</u>	58	53	-2,8	-2,8
PE_ParC80G1_PE	80	1	1	77(CAC) / 79(GAT)	TACCATCCGCAC <u>GGCGATG</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80C1_PE	80	1	1	77(CAC) / 79(GAT)	TACCATCCGCAC <u>GGCGATC</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80A2_PE	80	2	1	77(CAC) / 79(GAT)	ACCATCCGCAC <u>GGCGATAA</u>	58	53	-2,8	-2,8
PE_ParC80T2_PE	80	2	1	77(CAC) / 79(GAT)	ACCATCCGCAC <u>GGCGATAT</u>	58	53	-2,8	-2,8
PE_ParC80G2_PE	80	2	1	77(CAC) / 79(GAT)	ACCATCCGCAC <u>GGCGATAG</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80C2_PE	80	2	1	77(CAC) / 79(GAT)	ACCATCCGCAC <u>GGCGATAC</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80A3_PE	80	3	1	77(CAC) / 79(GAT)	CCATCCGCAC <u>GGCGATAGA</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80T3_PE	80	3	1	77(CAC) / 79(GAT)	CCATCCGCAC <u>GGCGATAGT</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80G3_PE	80	3	1	77(CAC) / 79(GAT)	CCATCCGCAC <u>GGCGATAGG</u>	68	58	-2,8	-2,8
PE_ParC80C3_PE	80	3	1	77(CAC) / 79(GAT)	CCATCCGCAC <u>GGCGATAGC</u>	68	58	-2,8	-2,8
PE_ParC80A4_PE	80	1	2	77(CAT) / 79(GAC)	TACCATCCGCAT <u>GGCGACA</u>	58	53	-2,8	-2,8
PE_ParC80T4_PE	80	1	2	77(CAT) / 79(GAC)	TACCATCCGCAT <u>GGCGACT</u>	58	53	-2,8	-2,8
PE_ParC80G4_PE	80	1	2	77(CAT) / 79(GAC)	TACCATCCGCAT <u>GGCGACG</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80C4_PE	80	1	2	77(CAT) / 79(GAC)	TACCATCCGCAT <u>GGCGACC</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80A5_PE	80	2	2	77(CAT) / 79(GAC)	ACCATCCGCAT <u>GGCGACAA</u>	58	53	-2,8	-2,8
PE_ParC80T5_PE	80	2	2	77(CAT) / 79(GAC)	ACCATCCGCAT <u>GGCGACAT</u>	58	53	-2,8	-2,8
PE_ParC80G5_PE	80	2	2	77(CAT) / 79(GAC)	ACCATCCGCAT <u>GGCGACAG</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80C5_PE	80	2	2	77(CAT) / 79(GAC)	ACCATCCGCAT <u>GGCGACAC</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80A6_PE	80	3	2	77(CAT) / 79(GAC)	CCATCCGCAT <u>GGCGACAGA</u>	63	55	-2,8	-2,8
PE_ParC80T6_PE	80	3	2	77(CAT) / 79(GAC)	CCATCCGCAT <u>GGCGACAGT</u>	63	55	-2,8	-2,8

Tabelle 3.10 Fortsetzung

Name	AS Position	Basen Position	Genotyp	stille Mutation	Sequenz (5' → 3') *	GC %	Tm ** °C	Hairpin kcal/mol ***	Dimer kcal/mol ***
PE_ParC80G6_PE	80	3	2	77(CAT) / 79(GAC)	CCATCCGCATGGCGACAGG	68	58	-2,8	-2,8
PE_ParC80C6_PE	80	3	2	77(CAT) / 79(GAC)	CCATCCGCATGGCGACAGC	68	58	-2,8	-2,8
PE_ParC80AU1_PE	80	1	universal	77(CAI) / 79(GAI)	TACCATCCGCAIGGCGAIA	-	-	-	-
PE_ParC80TU1_PE	80	1	universal	77(CAI) / 79(GAI)	TACCATCCGCAIGGCGAIIT	-	-	-	-
PE_ParC80GU1_PE	80	1	universal	77(CAI) / 79(GAI)	TACCATCCGCAIGGCGAIG	-	-	-	-
PE_ParC80CU1_PE	80	1	universal	77(CAI) / 79(GAI)	TACCATCCGCAIGGCGAIC	-	-	-	-
PE_ParC80AU2_PE	80	2	universal	77(CAI) / 79(GAI)	ACCATCCGCAIGGCGAIAA	-	-	-	-
PE_ParC80TU2_PE	80	2	universal	77(CAI) / 79(GAI)	ACCATCCGCAIGGCGAIAT	-	-	-	-
PE_ParC80GU2_PE	80	2	universal	77(CAI) / 79(GAI)	ACCATCCGCAIGGCGAIAIAG	-	-	-	-
PE_ParC80CU2_PE	80	2	universal	77(CAI) / 79(GAI)	ACCATCCGCAIGGCGAIAIC	-	-	-	-
PE_ParC80AU3_PE	80	3	universal	77(CAI) / 79(GAI)	CCATCCGCAIGGCGAIAA	-	-	-	-
PE_ParC80TU3_PE	80	3	universal	77(CAI) / 79(GAI)	CCATCCGCAIGGCGAIAIT	-	-	-	-
PE_ParC80GU3_PE	80	3	universal	77(CAI) / 79(GAI)	CCATCCGCAIGGCGAIAIAGG	-	-	-	-
PE_ParC80CU3_PE	80	3	universal	77(CAI) / 79(GAI)	CCATCCGCAIGGCGAIAIGC	-	-	-	-
PE_ParC84A1i_PE	84	1	1	87(GTC)	CCATCAGGACCATCGCTTT	53	51	0,0	0,0
PE_ParC84T1i_PE	84	1	1	87(GTC)	CCATCAGGACCATCGCTTA	53	51	0,0	0,0
PE_ParC84G1i_PE	84	1	1	87(GTC)	CCATCAGGACCATCGCTTC	58	53	0,0	0,0
PE_ParC84C1i_PE	84	1	1	87(GTC)	CCATCAGGACCATCGCTTG	58	53	0,0	0,0
PE_ParC84A2i_PE	84	2	1	87(GTC)	GCCATCAGGACCATCGCTT	58	53	0,0	0,0
PE_ParC84T2i_PE	84	2	1	87(GTC)	GCCATCAGGACCATCGCTA	58	53	0,0	0,0
PE_ParC84G2i_PE	84	2	1	87(GTC)	GCCATCAGGACCATCGCTC	63	55	0,0	0,0
PE_ParC84C2i_PE	84	2	1	87(GTC)	GCCATCAGGACCATCGCTG	63	55	0,0	0,0
PE_ParC84A3i_PE	84	1	2	87(GTG)	CCATCAGCACCATCGCTTT	53	51	-1,7	-1,7
PE_ParC84T3i_PE	84	1	2	87(GTG)	CCATCAGCACCATCGCTTA	53	51	-1,7	-1,7
PE_ParC84G3i_PE	84	1	2	87(GTG)	CCATCAGCACCATCGCTTC	58	53	-1,7	-1,7
PE_ParC84C3i_PE	84	1	2	87(GTG)	CCATCAGCACCATCGCTTG	58	53	-1,7	-1,7
PE_ParC84A4i_PE	84	2	2	87(GTG)	GCCATCAGCACCATCGCTT	58	53	-1,7	-1,7
PE_ParC84T4i_PE	84	2	2	87(GTG)	GCCATCAGCACCATCGCTA	58	53	-1,7	-1,7
PE_ParC84G4i_PE	84	2	2	87(GTG)	GCCATCAGCACCATCGCTC	63	55	-1,7	-1,7
PE_ParC84C4i_PE	84	2	2	87(GTG)	GCCATCAGCACCATCGCTG	63	55	0,0	0,0
PE_ParC84AU1i_PE	84	1	universal	87(GTI)	CCATCAGIACCATCGCTTT	-	-	-	-
PE_ParC84TU1i_PE	84	1	universal	87(GTI)	CCATCAGIACCATCGCTTA	-	-	-	-
PE_ParC84GU1i_PE	84	1	universal	87(GTI)	CCATCAGIACCATCGCTTC	-	-	-	-
PE_ParC84CU1i_PE	84	1	universal	87(GTI)	CCATCAGIACCATCGCTTG	-	-	-	-
PE_ParC84AU2i_PE	84	2	universal	87(GTI)	GCCATCAGIACCATCGCTT	-	-	-	-
PE_ParC84TU2i_PE	84	2	universal	87(GTI)	GCCATCAGIACCATCGCTA	-	-	-	-
PE_ParC84GU2i_PE	84	2	universal	87(GTI)	GCCATCAGIACCATCGCTC	-	-	-	-
PE_ParC84CU2i_PE	84	2	universal	87(GTI)	GCCATCAGIACCATCGCTG	-	-	-	-

* Alle Sonden trugen am 5' Ende noch einen Poly-dT-Abstandhalter von 14 Basen und eine C6-Aminomodifikation, die hier nicht dargestellt sind.

** Tm wurde berechnet mittels OligoCalculator (<http://trishul.sci.gu.edu.au/tools/OligoCalculator.html>) unter Verwendung von 0.195M Salzkonzentration (1x SSC).

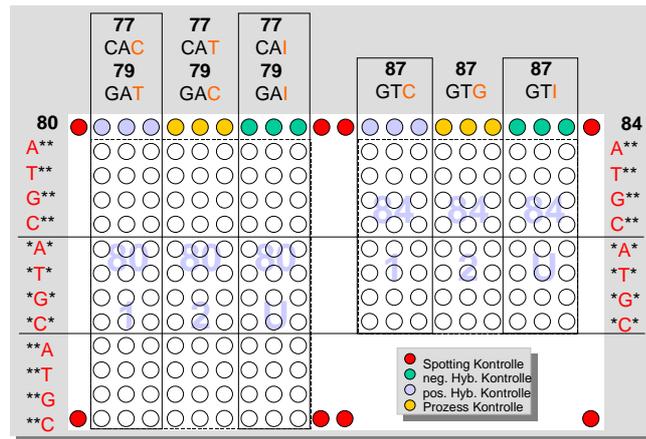
*** ΔG der Sekundärstrukturen wurde berechnet mit Hilfe von Software Array Designer, dessen Kalkulation auf der Methode von SantaLucia basiert⁷⁴.

3.2.2.2 Entwicklung und Optimierung des Protokolls für ASPE

Es gibt zwar einige Protokolle für ASPE, die von unterschiedlichen Gruppen entwickelt wurden, aber keines davon war geeignet für die klinische Anwendung. Deswegen wurde zunächst ein neues Protokoll erstellt, das diesen Anforderungen entsprach: niedrige Kosten, wenig Arbeitsaufwand, einfache Durchführung und kompatibel zum *gyrA*-Array. Dabei wurde unmarkierte Ziel-DNS verwendet. Die Markierung fand während der Primer-Extensions-Reaktion auf dem Objektträger statt. Daher wird sie auch als Festphasen-Primer-Extension bezeichnet. Die auf Objektträgern immobilisierte Sonde diente als Primer. Kein zusätzliches Gerät, Enzym und Verbrauchsmaterial zum *gyrA*-Array wurde benötigt. Ebenfalls wurden die gleichen Bedingungen für die Hybridisierung wie bei dem *gyrA*-Array eingestellt. Allerdings war hier die automatisierte Hybridisierungsstation im Einsatz wegen des geringen Hintergrunds durch effektives Waschen.

Hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität wurde die Primer-Extensions-Reaktion optimiert. Parameter wie dNTP Konzentration, Temperatur der Primer-Extensions-Reaktion, Menge der Polymerase, Fragmentierung der Ziel-DNS, Zeit der Primer-Extensions-Reaktion und Menge der Ziel-DNS, die Einfluss auf diese zwei Faktoren haben können, wurden untersucht. Die Experimente erfolgten durchgehend mit einem Isolat (*E. coli* 5). Der gleiche *cut-off*-Wert wie bei dem *gyrA*-Array wurde hier festgelegt: 300 für die PM-Intensität, 1.5 für das PM/MM-Verhältnis. Auch hier wurden PM-Intensität und PM/MM-Verhältnis als Kriterien für die Sensitivität und Spezifität verwendet, um die unterschiedlichen Bedingungen vergleichen zu können. Nur der Probensatz für den korrekten Genotyp wurde bei der Auswertung berücksichtigt. Für jede Bedingung wurden drei Arrays eingesetzt. Mittelwerte aus neun Spots wurden berechnet.

Abbildung 3.30 zeigt das Layout. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.31 bis 3.34 für jeden Parameter dargestellt. Im Allgemeinen war die PM-Intensität der Position 84 höher als die der Position 80, während das Ergebnis für die PM/MM-Verhältnisse umgekehrt war. Eine Sekundärstruktur war für die niedrige Intensität von Position 80 verantwortlich (siehe Tabelle 3.9). Auch bei einer Hybridisierung mit markierter Ziel-DNS zeigten die Sonden für Position 84 eine höhere Intensität. Dies bestätigte wiederum die theoretische Berechnung. Die unterschiedliche Intensität beider Positionen war auf die Hybridisierung, nicht auf die Primer-Extensions-Reaktion zurückzuführen. Die universelle Sonde zeigte ein wesentlich niedrigeres Signal im Vergleich zur spezifischen PM-Sonde. Die auf die dritte Base der Position 80 gerichtete Sonde ermittelte eine extrem niedrige Intensität für dieses Isolat, was auf das MM in der vorletzten Position zurückzuführen war. Da die Intensitäten teilweise unter dem *cut-off*-Wert von 300 lagen, wurde diese SNP-Position bei der Beurteilung nicht berücksichtigt.

Abbildung 3.30: Layout des *parC*-Arrays

dNTP Konzentration

Die *dNTP*-Mischung enthielt außer unmarkiertem *dATP*, *dTTP* und *dGTP*, auch *Cy3-dCTP*. Eine Voruntersuchung zeigte, dass die Verwendung von 100% *Cy3-dCTP* eine höhere Intensität als die von 50% *Cy3-dCTP* (*dCTP*:*Cy3-dCTP* = 1:1) erzielte. Daher wurde 100% *Cy3-dCTP* für alle Experimente eingesetzt. Wie in Abbildung 3.31 gezeigt, hatte die *dNTP*-Konzentration keinen großen Einfluss auf die *PM*-Intensität von Position 84. Aber die *PM*-Intensität von Position 80 erhöhte sich erheblich mit zunehmender *dNTP*-Konzentration von 0.1 bis 10 μM . Im Gegensatz zur *PM*-Intensität verringerte sich das *PM/MM*-Verhältnis mit zunehmender *dNTP*-Konzentration für diese Position. Der niedrigste Wert der *PM*-Intensität und des *PM/MM*-Verhältnisses bei 0.1 μM *dNTP* war jeweils 9670 bzw. 1.6. Dies ist akzeptabel für die *SNP*-Detektion. Weil ein starkes Hintergrundsignal bei der Verwendung von 1 und 10 μM *dNTP* beobachtet wurde, wurde 0.1 μM *dNTP* zur weiteren Optimierung festgelegt. Im Vergleich zur Markierungs-PCR im *ASOH*-Experiment wurde die benötigte Menge von *Cy3-dCTP*, das teuerste Verbrauchsmaterial in diesem Experiment, um mehr als das 250fach reduziert, d.h. die Kosten werden hierdurch drastisch gesenkt.

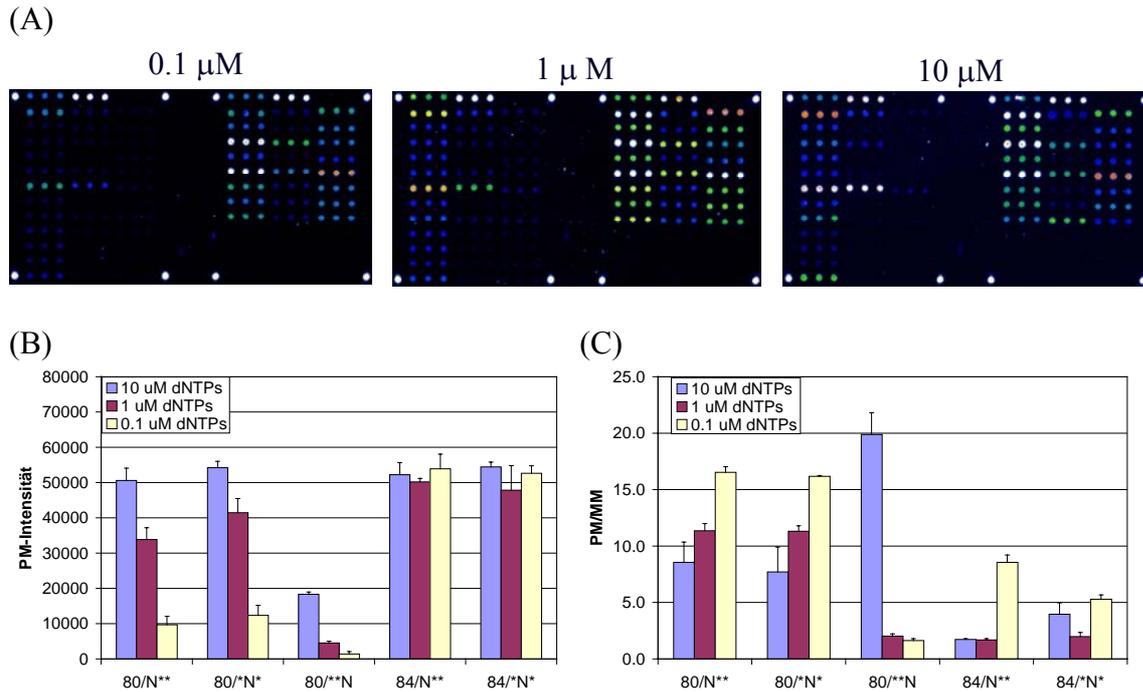


Abbildung 3.31: Der Einfluss der dNTP-Konzentration auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=9$. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis. (Der rechte Bereich stellt die Ergebnisse für Position 80 und der linke Bereich für Position 84 dar.)

Temperatur der Primer-Extensions-Reaktion

Vier Temperaturen (45°C , 55°C , 65°C und 72°C) zwischen der Hybridisierungstemperatur (45°C) und der optimalen Reaktionstemperatur der *Taq* Polymerase (72°C) wurde für die Primer-Extensions-Reaktion getestet (Abbildung 3.32). Die PM-Intensität (Abbildung 3.32B) nahm geringfügig zu von 72°C bis 55°C , gefolgt von einer Abnahme bei 45°C für beide Positionen. Der niedrigste Wert von 7816 war noch akzeptabel. Das PM/MM Verhältnis (Abbildung 3.32C) nahm mit verringerter Temperatur deutlich ab. Das PM/MM-Verhältnis der Sonde für die zweite Base von Position 84 war jeweils nur 1.4 bzw. 1.2 bei 45 bzw. 55°C . Zur optimalen Diskriminierung des PM vom MM, wurde eine Temperatur von 72°C zur weiteren Optimierung festgelegt.

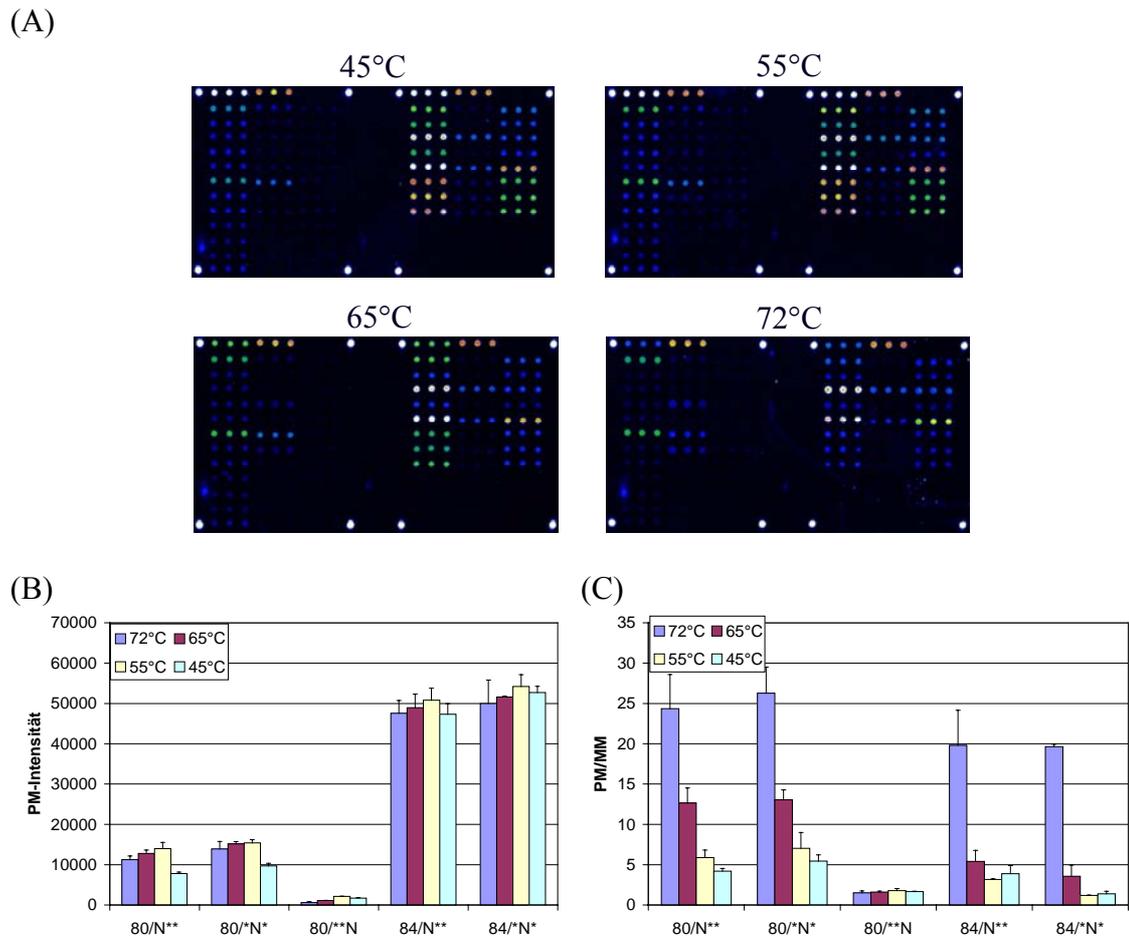


Abbildung 3.32: Der Einfluss der Temperatur der Primer-Extensions-Reaktion auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=9$. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis. (Der rechte Bereich stellt die Ergebnisse für Position 80 und der linke Bereich für Position 84 dar.)

Menge der Taq Polymerase

Der Einfluss der *Taq*-Polymerase-Menge auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis ist in Abbildung 3.33 dargestellt. Mit erhöhter Menge von Polymerase (2.5, 5 und 10 U) erhöhte sich die PM-Intensität (Abbildung 3.33B), während das PM/MM-Verhältnis (Abbildung 3.33C) sich verringerte. In dieser Versuchsreihe entsprach die niedrigste PM-Intensität 3613 und das kleinste PM/MM-Verhältnis 6.4. Dies ist für die SNP-Detektion zwar akzeptabel, aber den limitierenden Faktor stellte die PM-Intensität von Position 80 dar. Deswegen wurde die PM-Intensität bei der Berücksichtigung stärker gewichtet und 10 U zur weiteren Optimierung ausgewählt.

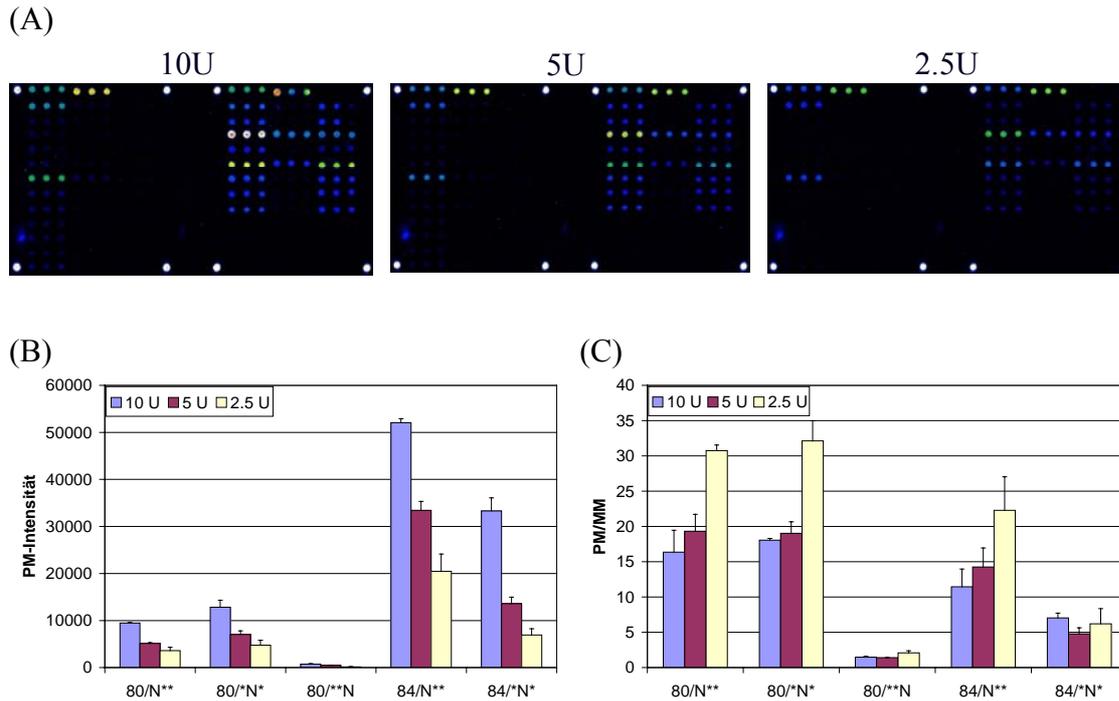


Abbildung 3.33: Der Einfluss der Menge der *Taq* Polymerase auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=9$. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis. (Der rechte Bereich stellt die Ergebnisse für Position 80 und der linke Bereich für Position 84 dar.)

Fragmentierung der Ziel-DNS

Die Fragmentierung der Ziel-DNS hat einen wesentlichen Einfluss auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis (Abbildung 3.34). Ohne Fragmentierung zeigten die Sonden für Position 80 kein nachweisbares Signal, während sich die PM-Intensität für die erste und zweite Base nach der Fragmentierung jeweils bis auf 9460 und 12819 erhöhte (Abbildung 3.34B). Obwohl demgegenüber die PM-Intensität für die zweite Base von Position 84 nach der Fragmentierung abnahm, war sie immer noch mindestens 2.5fach höher als von Position 80. Der positive Effekt der Fragmentierung auf das PM/MM-Verhältnis ist für beide Positionen in Abbildung 3.34C deutlich zu sehen. Für weitere Experimente wurde daher fragmentierte Ziel-DNS verwendet.

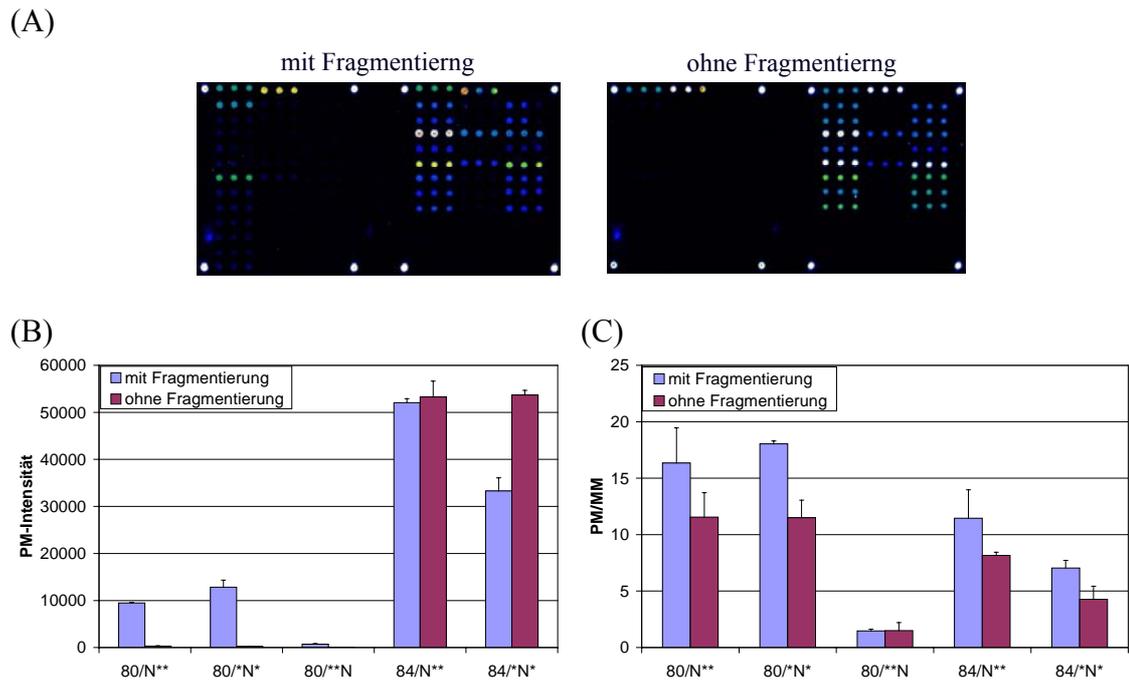


Abbildung 3.34: Der Einfluss der Fragmentierung der Ziel-DNS auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=9$. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis. (Der rechte Bereich stellt die Ergebnisse für Position 80 und der linke Bereich für Position 84 dar.)

Zeit der Primer-Extensions-Reaktion

Der Einfluss der Dauer der Primer-Extensions-Reaktion auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis wurde untersucht (Abbildung 3.35). Mit längerer Zeit der Primer-Extensions-Reaktion (10 Minuten, 30min bis 60 min) erhöhte sich die PM-Intensität (Abbildung 3.35B) mit Ausnahme von 30 Minuten für Position 84. Dagegen verringerte sich das PM/MM-Verhältnis (Abbildung 3.35C) mit Ausnahme von 10 Minuten und der zweiten Base für beide Positionen. Obwohl bei einer Primer-Extensions-Reaktion von 10 Minuten die SNPs bereits richtig detektiert werden konnten, wurde 30 Minuten für eine sichere Identifikation der SNPs in einer unbekannt Probe gewählt.

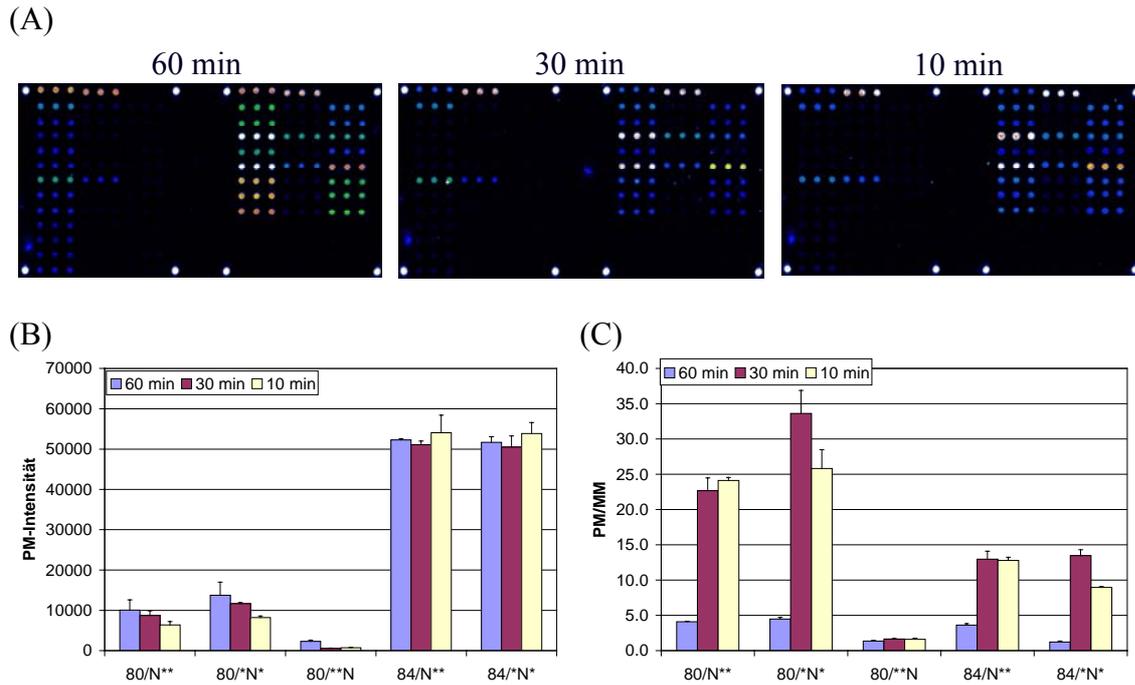


Abbildung 3.35: Der Einfluss der Zeit der Primer-Extensions-Reaktion auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis, $n=9$. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis. (Der rechte Bereich stellt die Ergebnisse für Position 80 und der linke Bereich für Position 84 dar.)

Nach Optimierung aller obenerwähnten Parameter, wurden folgende Bedingungen für die Primer-Extensions-Reaktion festgelegt:

- dNTP Konzentration: 0.1 μM
- Reaktionstemperatur: 72°C
- Reaktionszeit: 30 Minuten
- Menge der *Taq* Polymerase: 10 U
- Ziel-DNS: fragmentierte

3.2.2.3 Sensitivitätstest

Unter der Verwendung von optimierten Bedingungen wurde die Sensitivität des *parC*-Arrays bestimmt. Dafür wurden unterschiedliche Mengen der Ziel-DNS eingesetzt. Der Einfluss der Ziel-DNS-Menge auf die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis sind in Abbildung 3.36 dargestellt. Mit abnehmender Ziel-DNS-Menge nahm die PM-Intensität von Position 84 ab. Für Position 80 blieb sie zunächst konstant von 0.125 bis 0.5 pmol. Bei der Ziel-DNS-Menge von 1 pmol erhöhte sie sich aber drastisch. Das PM/MM-Verhältnis nahm kontinuierlich von 0.125 zu 1 pmol ab. Nach diesem Experiment konnte 0.125 pmol Ziel-DNS mit einer PM-Intensität bzw. einem PM/MM-Verhältnis von mindestens 6548 bzw. 7.3 detektiert werden. Dadurch wurde eine vergleichbare Sensitivität wie bei dem *gyrA*-Array erreicht. Weitere Untersuchungen mit noch geringerer Ziel-DNS-Menge wurden hier nicht durchgeführt. Für die Validierung der Sonden wurde standardmäßig eine Ziel-DNS-Menge von 1 pmol verwendet.

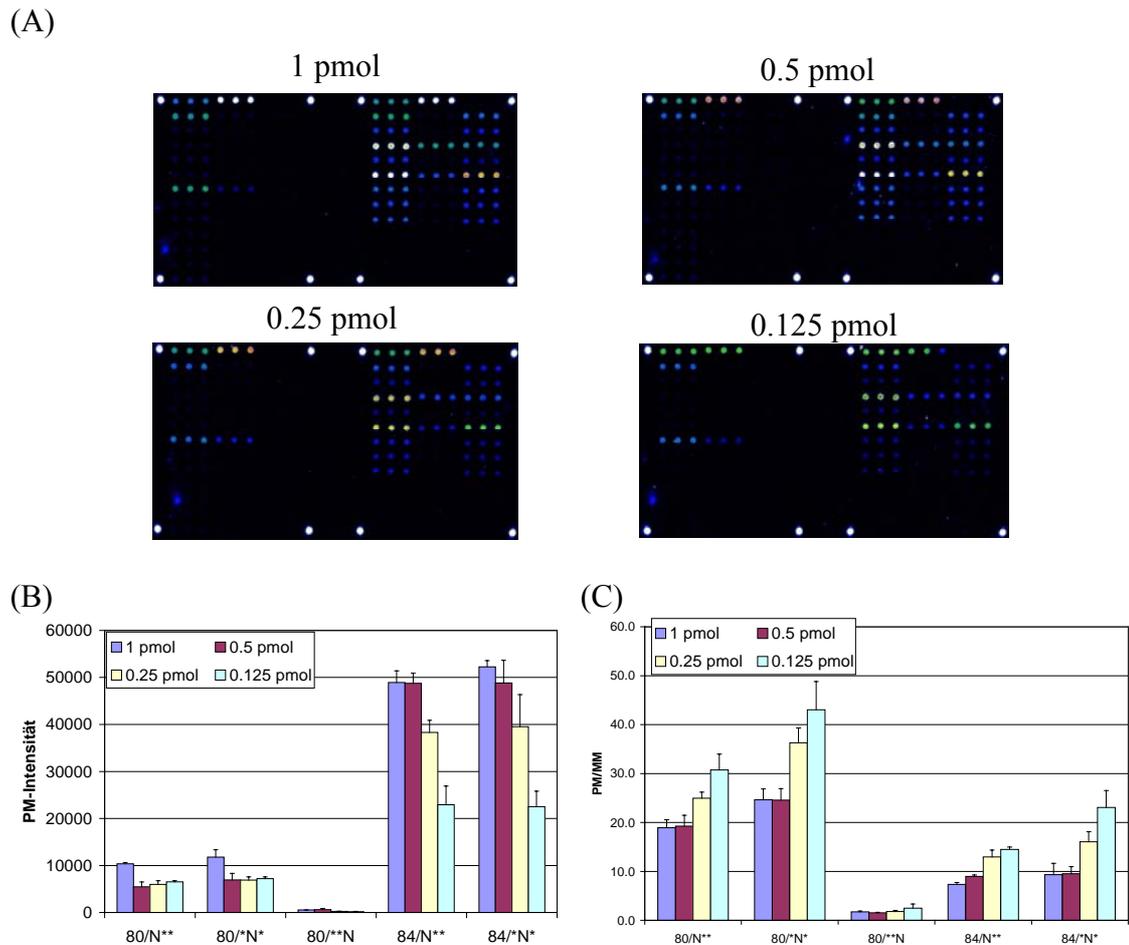


Abbildung 3.36: Mikroarray-Ergebnisse der Sensitivitätsbestimmung unter Verwendung verschiedener Mengen der Ziel-DNS (0.125 - 1 pmol), n=9. A: Eines von drei Mikroarray-Bildern pro Bedingung; B: PM-Intensität; C: PM/MM-Verhältnis. (Der rechte Bereich stellt die Ergebnisse für Position 80 und der linke Bereich für Position 84 dar.)

3.2.2.4 Validierung der Sonden

Die Spezifität der Sonden und deren Anwendbarkeit für klinische Isolate wurden mit 36 klinischen *E. coli* Isolaten validiert. Für jedes Isolat wurde ein Array (n=3) verwendet. Das Bild nach der Gel-Elektrophorese ist in Abbildung 3.37 dargestellt. Die Mikroarray-Daten sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst. Alle *missense* Mutationen dieser 36 Isolate konnten bei Verwendung von 1 pmol Ziel-DNS in Übereinstimmung mit dem Sequenzierungs-Ergebnis richtig identifiziert werden. Mit Ausnahme der letzten Base der Position 80 entsprachen die PM-Intensität bzw. das PM/MM-Verhältnis im schlechtesten Fall jeweils 599 bzw. 1.7, was aber für die SNP-Detektion akzeptabel war. Die höchste MM-Intensität entsprach 65.7% der PM-Intensität. Dies erlaubte eine eindeutige Identifikation des PM.

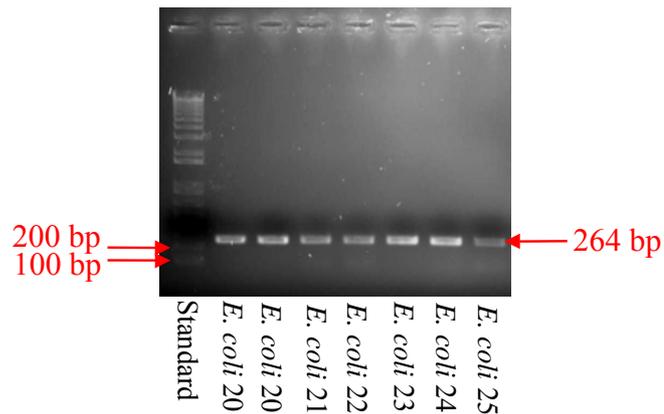


Abbildung 3.37: Gel-Elektrophorese des *parC*-Amplikons. (Als Beispiel werden hier nur sieben *E. coli* Isolate gezeigt.)

Tabelle 3.11: Mikroarray-Daten der 36 klinischen Isolate

		absolute Intensität	MM (relative Intensity 2)				PM/MM	Typ 1/Typ 2
			A	T	G	C		
Position 80	N**	> 599	-	< 30.0%	< 24.4%	< 62.0%	> 2.8	> 1.7
	N	> 737	< 40.2%	-	< 28.7%	< 41.5%	> 3.1	
Position 84	N**	> 1594	< 47.6%	< 43.4%	-	< 40.0%	> 2.3	> 2.1
	N	> 2121	< 51.0%	< 55.6%	< 59.3%	< 65.7%	> 1.7	

Tabelle 3.12 zeigt einen Überblick über die mittels *parC*-Arrays detektierten *missense* Mutationen und stillen Mutationen.

Tabelle 3.12: Die durch *parC*-Array ermittelten Genotypen der 36 klinischen Isolate. (Position 80 und 84, die *missense* Mutationen besitzen, sind grau markiert. Isolate des Genotyps 2 sind mit grauer Schraffur markiert.)

Number	Pos. 77 (His)	Pos. 79 (Asp)	Pos. 80	Pos. 84	Pos. 87 (Val)
<i>E. coli</i> 1	CAC	GAT	AGC (Ser)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 2	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 3	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 4	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 5	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 6	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 7	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 8	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 9	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 10	CAT	GAC	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTG
<i>E. coli</i> 11	CAC	GAT	ATT (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 12	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 13	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 14	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 15	CAC	GAT	ATT (Ile)	GTA (Val)	GTC
<i>E. coli</i> 16	CAC	GAT	ATT (Ile)	GTA (Val)	GTC
<i>E. coli</i> 17	CAC	GAT	ATT (Ile)	GTA (Val)	GTC
<i>E. coli</i> 18	CAC	GAT	ATT (Ile)	GTA (Val)	GTC
<i>E. coli</i> 19	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 20	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 21	CAT	GAC	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTG
<i>E. coli</i> 22	CAT	GAC	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTG
<i>E. coli</i> 23	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 24	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 25	CAT	GAC	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTG
<i>E. coli</i> 26	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 27	CAC	GAT	AGC (Ser)	AAA (Lys)	GTC
<i>E. coli</i> 28	CAC	GAT	AGT (Ser)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 29	CAT	GAC	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTG
<i>E. coli</i> 30	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 31	CAC	GAT	ATT (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 32	CAC	GAT	ATT (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 33	CAC	GAT	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTC
<i>E. coli</i> 34	CAT	GAC	ATC (Ile)	GAA (Glu)	GTG
<i>E. coli</i> 35	CAC	GAT	AGC (Ser)	AAA (Lys)	GTC
<i>E. coli</i> 36	CAC	GAT	ATT (Ile)	GAA (Glu)	GTC

Die Intensität der auf die dritte Base der Position 80 gerichteten Sonde, hing davon ab, ob die vorletzte Base ein PM oder ein MM war (Abbildung 3.38). Wie in Abbildung 3.38A, B, E und G dargestellt, wenn G in diese Position (d.h. ein PM) vorkam (*E. coli* 1 und *E. coli* 28), wurde ein Signal in Höhe von ca. 40000 detektiert, aber wenn ein T an dieser Position (d.h. ein MM) vorkam (*E. coli* 15 und *E. coli* 10), verringerten sich die Signale jeweils bis zu nur 766 bzw. 1598 (Abbildung 3.38C, D, I und K).

Das Verhältnis der Gesamtintensität zwischen den Genotyp-spezifischen Sonden und den nicht dem Genotyp entsprechenden Sonden war mindestens 1.7 bzw. 2.1 für Position 80 bzw. Position 84. Damit war es auch möglich, den korrekten Genotyp zu identifizieren.

Die Fluoreszenzbilder der Hybridisierung und die Fluoreszenzintensitäten von einem sensitiven Isolat (*E. coli* 1) und zwei resistenten *E. coli* Isolaten des Genotyps 1

(*E. coli* 1, 15 und 28) sowie einem resistenten *E. coli* Isolat (*E. coli* 10) des Genotyps 2 sind als Beispiele in Abbildung 3.38 dargestellt. Eine deutliche Diskriminierung zwischen dem PM und dem MM in Bezug auf die ersten zwei Basen der Position 80 bzw. 84 sowie zwischen den verschiedenen Genotypen konnte erreicht werden. Keine *missense* Mutation wurde in diesen zwei Positionen des sensitiven *E. coli* gefunden (Abbildung 3.38A, E und F). In einem resistenten *E. coli* von Genotyp 1 (*E. coli* 28) wurde auch keine *missense* Mutation entdeckt (Abbildung 3.38B, G und H). In einem anderen Isolat vom selben Genotyp (Abbildung 3.38C, I und H) hatten dagegen ein GT und ein AT Austausch an der Stelle der zweiten Base für beide Positionen stattgefunden. Dieser Doppelaustausch führte zu einer S80I und Q84V Doppelmutation. Das resistente Isolat von Genotyp 2 hatte den gleichen GT Austausch, der eine S80I Einzelmutation verursachte. Das resistente *E. coli* Isolat (*E. coli* 28), das keine Mutation in diesen zwei Positionen in *parC* besaß, hatte eine D87G Einzelmutation in *gyrA*, die durch den *gyrA*-Array detektiert werden konnte (Tabelle 3.4).

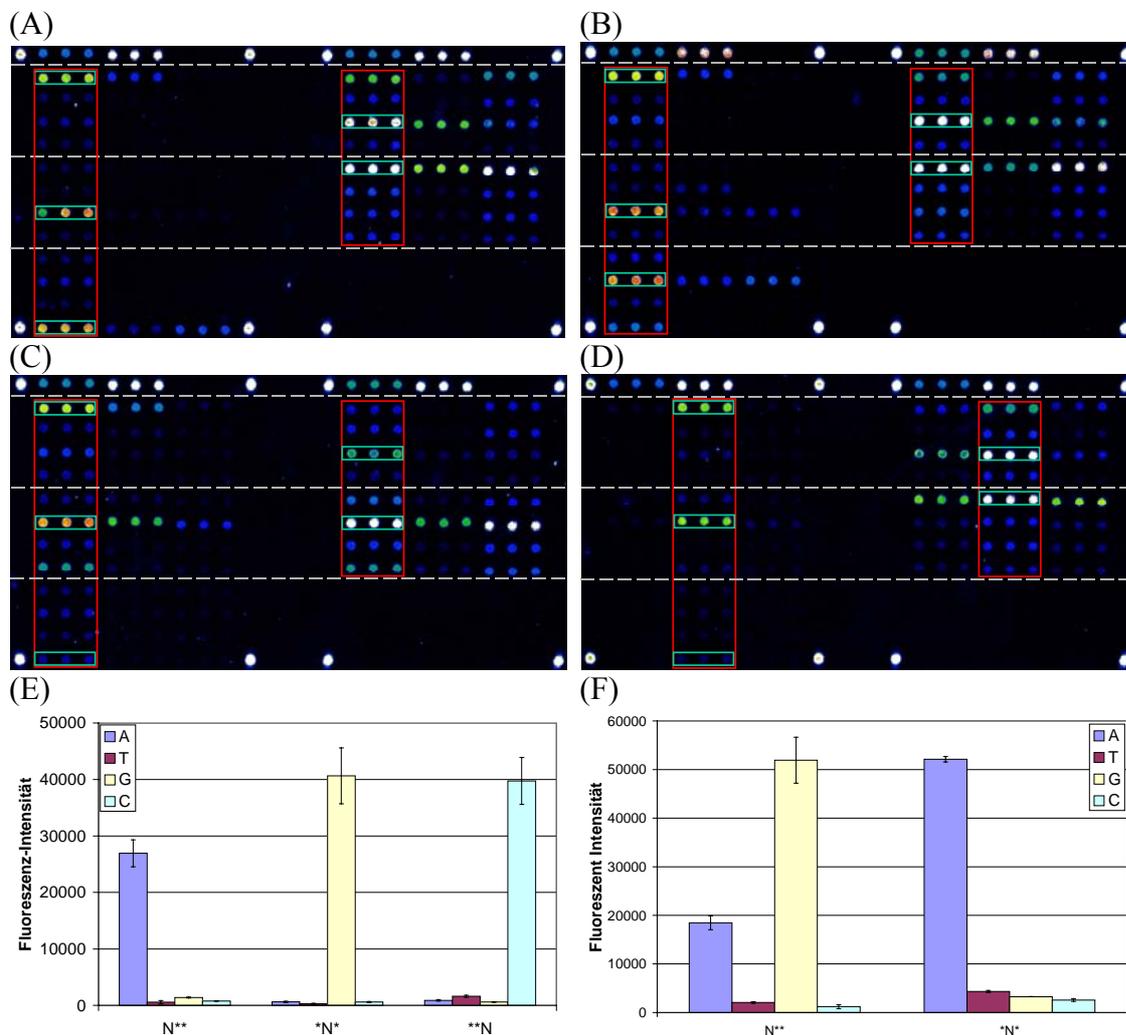


Abbildung 3.38 Fortsetzung

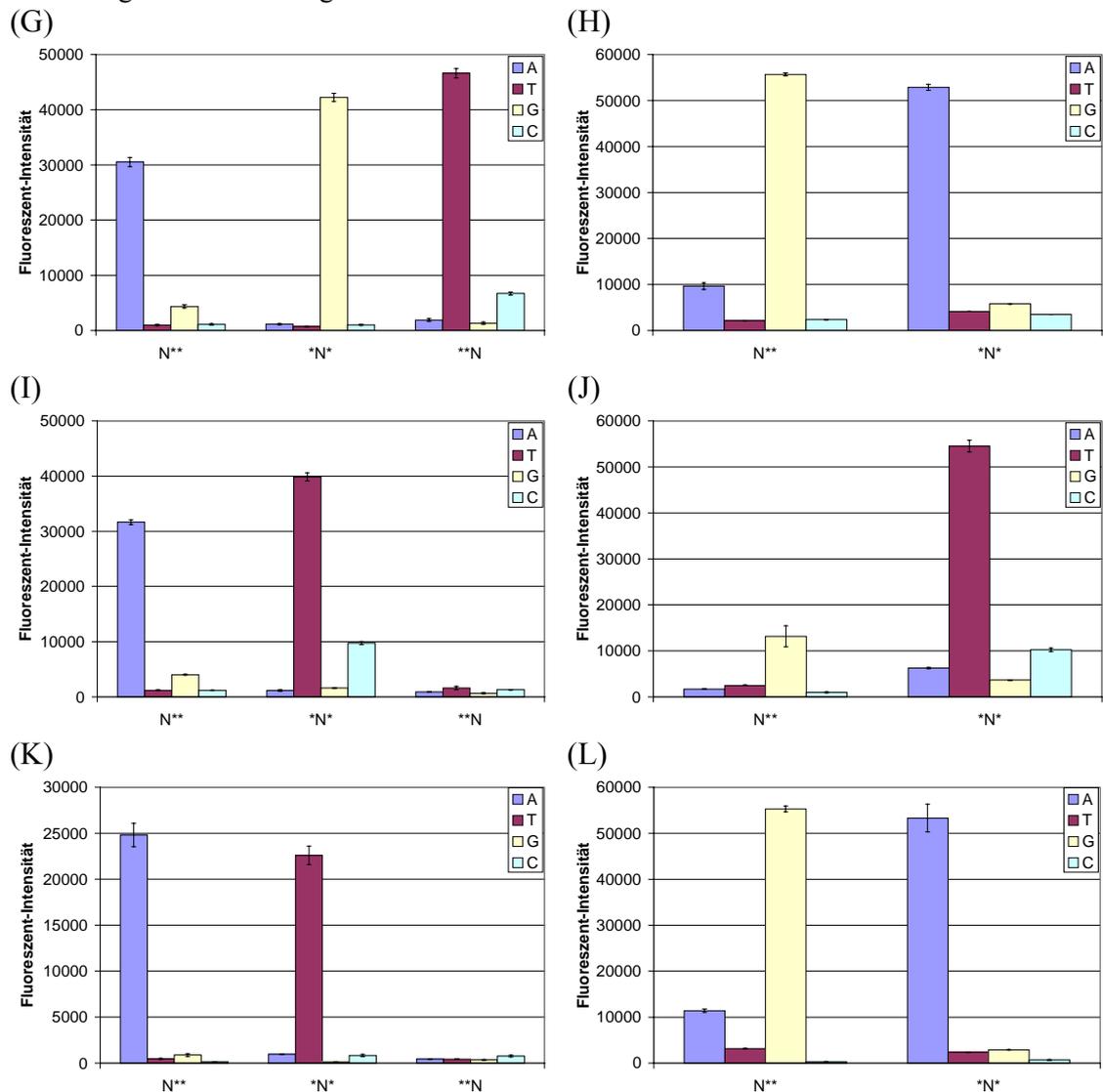


Abbildung 3.38: Mikroarray-Ergebnisse von vier klinischen *E. coli* Isolaten nach einer Stunde Hybridisierung mit 1 pmol Ziel-DNS und 30 Minuten Primer-Extensions-Reaktion, n=3. A-D: Fluoreszenzbilder von einem Chinolon-sensitiven *E. coli* (*E. coli* 1), Genotyp 1 (A) und drei Chinolon-resistenten *E. coli*: Genotyp 1 (*E. coli* 28 und 15) (B-C) und Genotyp 2 (*E. coli* 10) (D); E und F: Quantifikation von Bildern A; G und H: Quantifikation von Bildern B; I und J: Quantifikation von Bildern C; K und L: Quantifikation von Bildern D; E, G, I und K: Position 80; F, H, J und L: Position 84. Der rote Rahmen zeigt den korrekten Genotyp und der grüne Rahmen zeigt den PM-Spot.

3.2.2.5 Untersuchung von Mischproben

Genauso wie bei dem *gyrA*-Array wurde die Fähigkeit des *parC*-Arrays zur Detektion von resistenten *E. coli* in Anwesenheit von einem Überschuss an sensitivem *E. coli* untersucht. Dem experimentellen Ansatz des *gyrA*-Arrays entsprechend wurde 140 ng genomische DNS eines sensitiven *E. coli* (Ser in Position 80) mit unterschiedlichem Anteil (1:0, 100:1, 10:, 1:1 und 0:1) an genomischer DNS aus einem resistenten *E. coli* Isolat (Ile in Position 80) gemischt und als Template für die PCR-Reaktion verwendet. Für jede Bedingung wurden drei Arrays eingesetzt. Die Ziel-DNS-Menge bzw. Hybridisierungszeit entsprach 1 pmol bzw. einer Stunde. Wie in Abbildung 3.39 dargestellt, erhöhte sich das Fluoreszenzsignal der resistenten Sonde (Ile) mit erhöhtem Anteil resistentem *E. coli* in der Mischung. Das Fluoreszenzsignal der

sensitiven Sonde (Ser) verringerte sich dagegen. Für den Vergleich der Intensitäten zwischen verschiedenen Experimenten wurde auch hier die absolute Intensität durch zwei Verfahren normiert (siehe Abschnitt 3.1.6). Es gab für die resistente Sonde kein erkennbares Signal gegenüber rein sensitivem *E. coli* und einer 100:1 Mischung. Über einem Mischungsverhältnis von 10:1 gab es ein nachweisbares Signal (relative Intensität von 12.2%) für den resistenten (Ser in Position 80) *E. coli*.

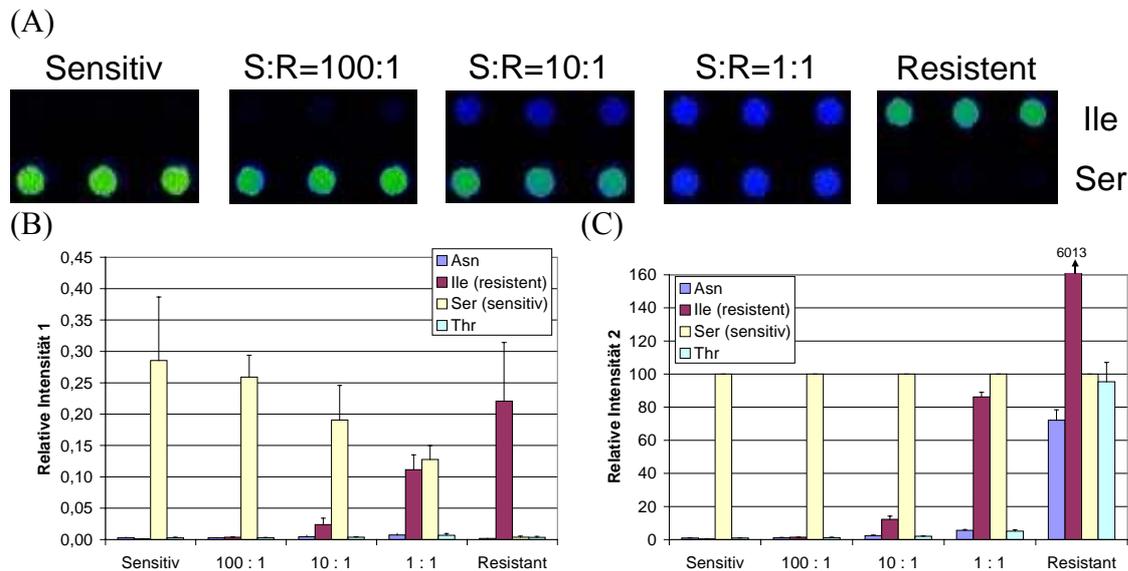


Abbildung 3.39: Mikroarray-Ergebnisse der DNS-Mischung aus einem sensitiven und einem resistenten *E. coli* in unterschiedlichem Mischverhältnis (1:0, 100:1, 10:1, 1:1 und 0:1), n=9. A: Fluoreszenz-Bilder (Nur die sensitiven und resistenten Sonden sind hier gezeigt.); B: relative Intensität 1, Position 84; C: relative Intensität 2, Position 84.

3.2.2.6 Untersuchung von aufgestockten Realproben mit *E. coli* in verschiedenen Verdünnungsstufen

Wie bei dem *gyrA*-Array wurde auch die Sensitivität des *parC*-Arrays einschließlich der DNS-Extraktion und der PCR anhand aufgestockter Urinproben mit unterschiedlichen Mengen der *E. coli* (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 CFU/ml) überprüft. 10000, 1000, 100, 10 und 1 CFU wurden jeweils für die PCR verwendet. Um ein zuverlässiges Ergebnis zu erhalten, wurden vier Isolate für diesen Test benutzt.

Als Beispiel sind die Fluoreszenzintensitäten der Sonden für ein Isolat in Abbildung 3.40 gezeigt. Die Sonden sind auf die erste Base der Position 80 und 84 gerichtet. Die Intensitäten der beiden Positionen nahmen mit abnehmender Menge von *E. coli* im Urin ab (ausgenommen von 10^6 CFU/ml). Trotzdem konnte *E. coli* bereits mit einer Konzentration von 100 CFU/ml mit einer akzeptablen PM-Intensität (784 für Position 80 und 3500 für Position 84) und einem annehmbaren PM/MM-Verhältnis (16.7 für Position 80 und 7.7 für Position 84) detektiert werden. Die niedrige PM-Intensität in der Probe mit der Konzentration von 10^6 CFU/ml war auf den Misserfolg der PCR-Aufreinigung zurückzuführen.

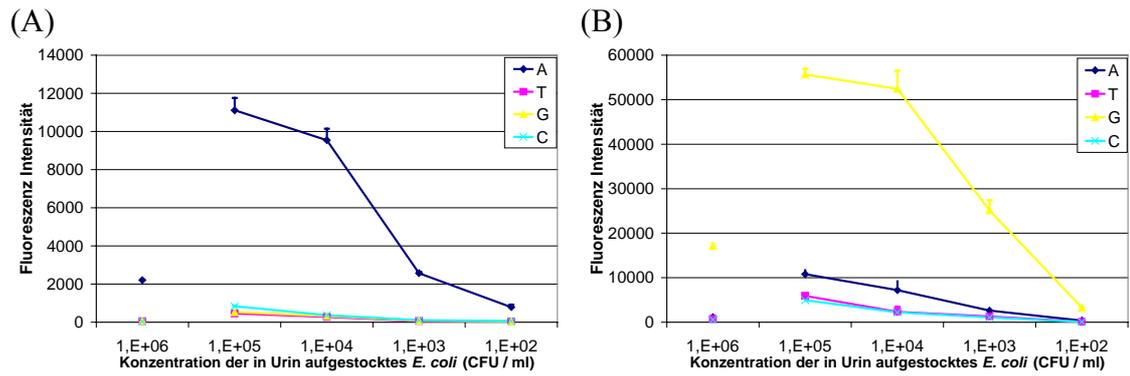


Abbildung 3.40: Mikroarray-Ergebnisse der aufgetockten Urinproben mit einem *E. coli* Isolate (*E. coli* 31) in verschiedenen Verdünnungsstufen, n=3. A: erste Base der Position 80; B: erste Base der Position 84

Ähnliches Verhalten wurde bei allen der getesteten vier Isolaten beobachtet (Abbildung 3.41). Zwei davon konnten in einer Konzentration von 100 CFU/ml detektiert werden, während die Nachweisgrenze für die anderen zwei Isolate 1000 CFU/ml war. Im Vergleich zum Mikroarray-Ergebnis war die Detektionsgrenze der Ethidiumbromid-Färbung wesentlich höher (Tabelle 3.13).

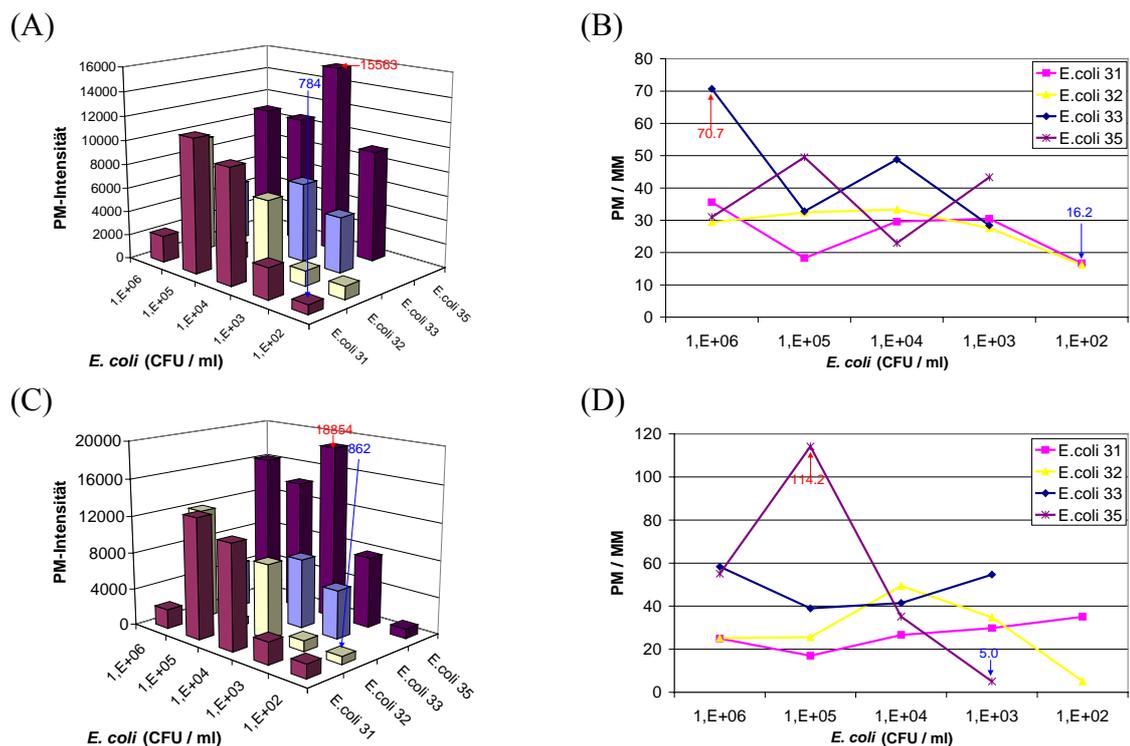


Abbildung 3.41 Fortsetzung

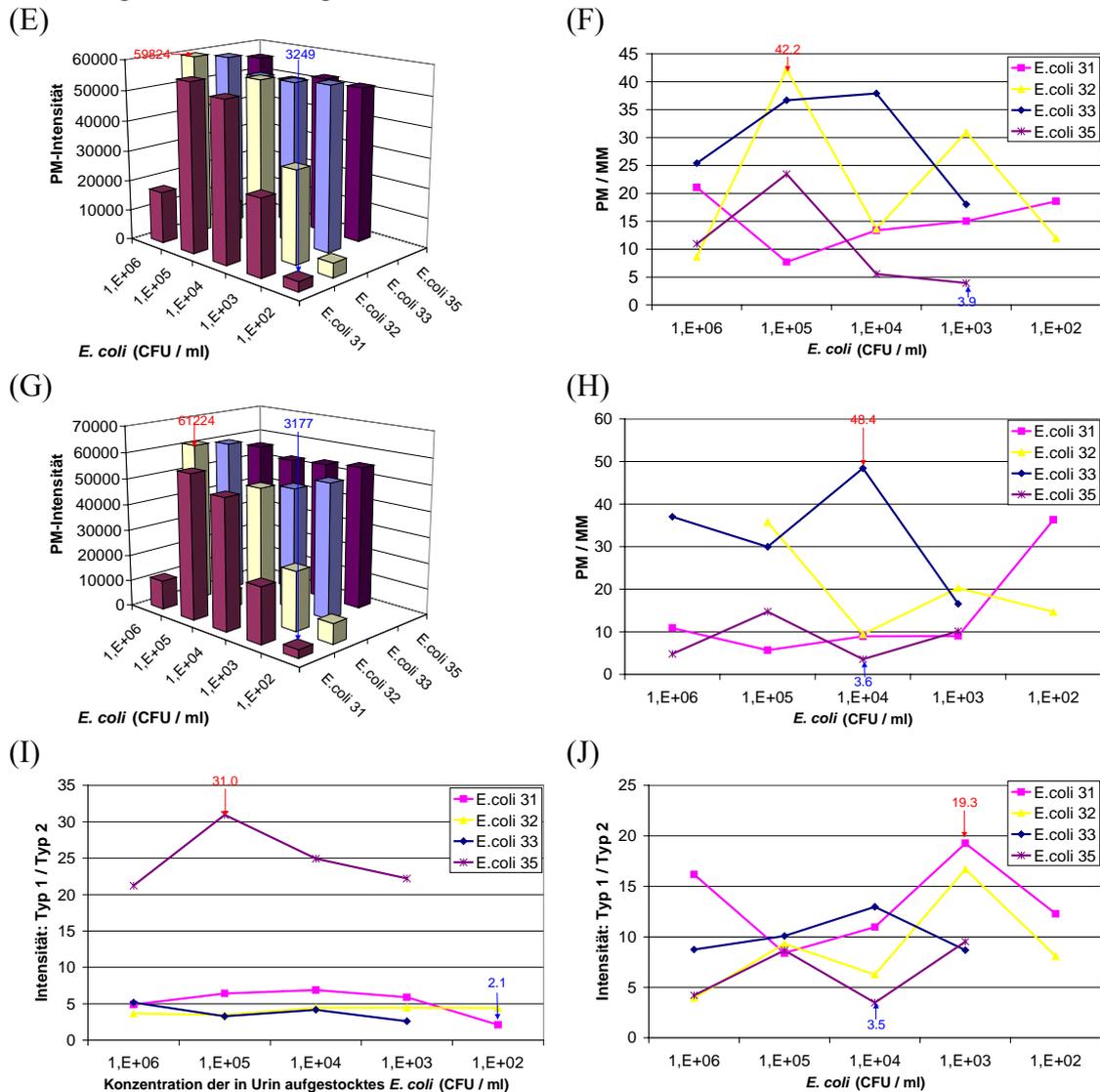


Abbildung 3.41: Mikroarray-Ergebnisse der aufgetockten Urinproben mit allen vier *E. coli* Isolaten in verschiedenen Verdünnungsstufen, $n=3$. A: erste Base der Position 80, PM-Intensität; B: erste Base der Position 80, PM/MM-Verhältnis; C: zweite Base der Position 80, PM-Intensität; D: zweite Base der Position 80, PM/MM-Verhältnis; E: erste Base der Position 84, PM-Intensität; F: erste Base der Position 84, PM/MM-Verhältnis; G: zweite Base der Position 84, PM-Intensität; H: zweite Base der Position 84, PM/MM-Verhältnis; I: Position 80, Intensität: Genotyp 1 / Genotyp 2; H: Position 84, Intensität: Genotyp 1 / Genotyp 2; Der rote und blaue Pfeil zeigen jeweils den höchsten und niedrigsten Wert. Die unter dem *cut-off*-Wert liegenden Messpunkte sind hier nicht gezeigt und wurden als nicht detektierbar definiert.

Tabelle 3.13: Detektionsgrenze des *parC*-Arrays für vier *E. coli* Isolate, aufgestockt in verschiedenen Verdünnungsstufen (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 CFU/ml) in Urin.

Nummer		Gel	Mikroarray
<i>E. coli</i> 31	10^6	-	+
	10^5	-	+
	10^4	-	+
	10^3	-	+
	10^2	-	+
<i>E. coli</i> 32	10^6	+	+
	10^5	-	+
	10^4	-	+
	10^3	-	+
	10^2	-	+
<i>E. coli</i> 33	10^6	+	+
	10^5	-	+
	10^4	-	+
	10^3	-	+
	10^2	-	-
<i>E. coli</i> 35	10^6	+	+
	10^5	+	+
	10^4	-	+
	10^3	-	+
	10^2	+	+
Negative		-	-

Die Mikroarray-Ergebnisse sind in Tabelle 3.14 zusammengefasst. Unter allen Experimenten mit den vier Isolaten in sechs Verdünnungsstufen, die ein nachweisbares Signal für beide Positionen zeigten, war die niedrigste PM-Intensität bzw. das PM/MM-Verhältnis jeweils 784 bzw. 3.6. Die MM-Intensität lag zwischen 5.2% und 49.7% der PM-Intensität, was eine deutliche Diskriminierung zwischen PM und MM erlaubte. Außerdem war das PM/MM-Verhältnis zwischen den Genotypen mindestens 2.1 bzw. 3.5 für Position 80 bzw. Position 84, was die korrekte Identifizierung des Genotyps bedeutete. Die negative Kontrolle zeigte kein Signal.

Tabelle 3.14: Mikroarray-Daten der aufgestockten Urinproben

		absolute Intensität	MM (relative Intensität)				PM/MM	Type1/Type2
			A	T	G	C		
Position 80	N**	> 784	-	< 5.5%	< 5.8%	< 9.0%	> 16.3	> 2.1
	N	> 811	< 5.2%	-	< 5.5%	< 49.7%	> 5.0	
Position 84	N**	> 2467	< 19.4%	< 15.9%	-	< 8.9%	> 3.9	> 3.5
	N	> 3177	-	< 29.6%	< 25.7%	< 28.9%	> 3.6	

3.3 Vereinigung von *gyrA* und *parC*-Array

Für eine simultane Detektion der Mutationen in den beiden Ziel-Genen für Chinolon-Resistenz wurden *parC* und *gyrA* in einem Array vereinigt. Dabei wurden das *gyrA*- (markierte) und *parC*- (nicht markierte) Fragment eines *E. coli* getrennt per PCR vervielfältigt, dann gemischt und in der Hybridisierung (1 pmol) eingesetzt. Die Hybridisierung fand auf einem Objektträger in der Hybridisierungsstation für eine

Stunde statt. Der *gyrA*- und *parC*-Array waren auf unterschiedlichen Bereichen des Objektträgers gedruckt. Ein Fluoreszenzbild der Hybridisierung (niedrige Auflösung) ist auf der rechten Seite in Abbildung 3.42 dargestellt. Nach dem Waschen wurde zunächst der *gyrA*-Array gescannt. Dann wurde die Primer-Extensions-Reaktion auf dem *parC*-Array für 30 Minuten durchgeführt. Schließlich wurde der *parC*-Array auch gescannt. Auf der linken Seite in Abbildung 3.42 wurden die Fluoreszenzbilder der beiden Arrays mit höherer Auflösung dargestellt. Eine Doppelmutation von S83L und D87N in *gyrA* (Layout siehe Abbildung 3.6A) und eine Einzelmutation von S80I in *parC* (Layout siehe Abbildung 3.30) wurde entdeckt. Dies stimmte mit den Ergebnissen der zwei separaten Arrays überein. Obwohl die QRDR von *gyrA* und *parC* eine hohe Sequenzhomologie aufweist, wurde keine Kreuzhybridisierung beobachtet.

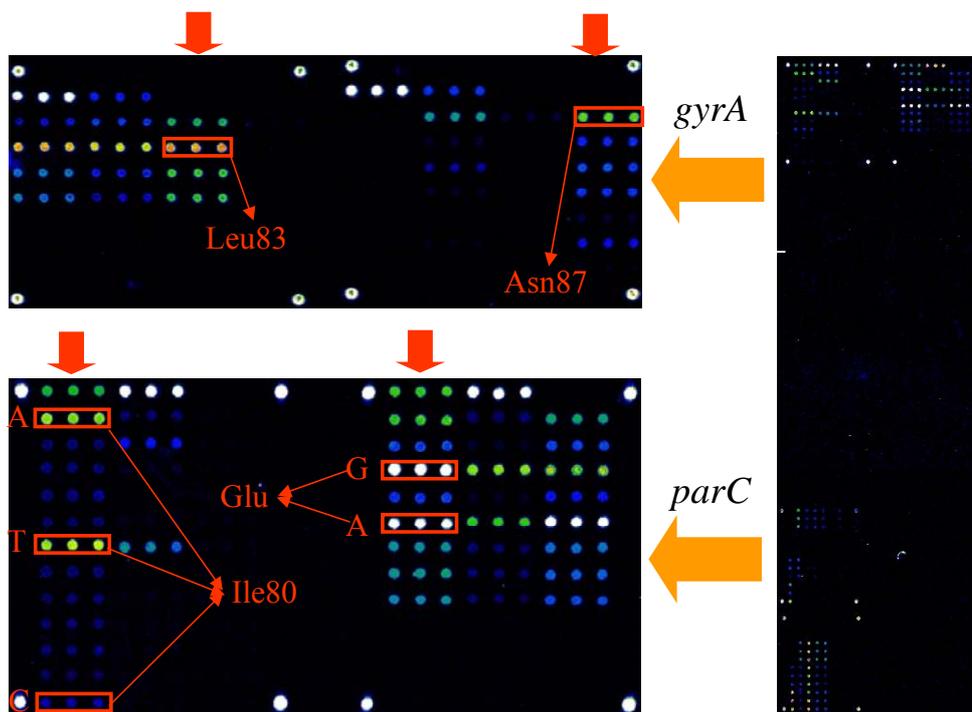


Abbildung 3.42: Simultane Detektion der Mutationen in *gyrA* und *parC* auf einem Array. Der große rote Pfeil zeigt den korrekten Genotyp und der rote Rahmen zeigt den PM-Spot mit der entsprechenden Aminosäure.

3.4 Chinolon-Resistenz Datenbank für die Mikroarray-Analyse von *E. coli*

DNS-Mikroarrays werden meist zur Untersuchung der Gen-Expression^{25,77} eingesetzt. Viele kommerzielle und nicht kommerzielle Programme für den Sondendesign und die Datenanalyse sind zu diesem Zweck entwickelt worden^{48,89,105}. Im Gegensatz dazu wurde der Programmierung für die SNP-Detektion wenig Aufmerksamkeit gewidmet. In der klinischen Mikrobiologie spielt die SNP-Detektion jedoch eine wichtige Rolle⁹⁸. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein spezielles Softwarepaket entwickelt, das an unsere klinische Anwendung angepasst ist.

3.4.1 Konzept

Für das Sondendesign sind Sequenzinformationen, insbesondere über die Resistenz-relevanten Mutationen erforderlich. Die Quellen solcher Informationen sind Sequenzdatenbanken, Literaturdatenbanken und Sequenzierungen klinischer Isolate. Daraus werden die Informationen extrahiert und in eine lokale Datenbank geladen. Anhand der in der lokalen Datenbank gespeicherten Informationen können die Sonden entworfen werden. Mit klinischen Isolaten wird die Qualität der Sonden validiert. Wenn die Sonden zum realen klinischen Isolat nicht perfekt komplementär sind, d.h. es treten mehr Mutationen auf, werden diese neuen Informationen in die Datenbank eingefügt und die Sonden werden neu entworfen. Für diese Analyse ist ein Hilfsprogramm entwickelt worden. Dieses Programm verarbeitet die Rohdaten des Mikroarray-Experimentes und kommuniziert mit der Datenbank, um die entsprechenden Literaturdaten zu finden.

Das Konzept ist in Abbildung 3.43 dargestellt. Die Einzelmodule (Parser, lokale Datenbank und Analyse-Software) wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt.

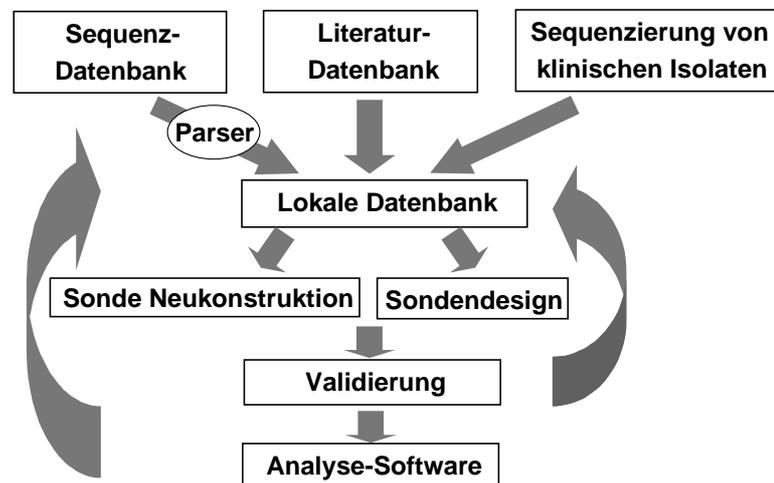


Abbildung 3.43: Entwurf eines Softwarepakets für die Mikroarray-Analyse der Chinolon-Resistenz in *E. coli*

3.4.2 Parser

Ein mit Perl programmiertes Parser wurde für die Extraktion der Sequenzen aus der Datenbank entwickelt. Mit Hilfe dieses Programms kann die BLAST-Ausgabe-Datei (Abbildung 3.44A) automatisch weiter verarbeitet werden. Alle Sequenzen von *E. coli* mit einer Mindestlänge von 200 bp wurden selektiert. Dabei wurde nur das abgegliche Sequenzfragment ausgeschnitten und als FASTA-Format gespeichert (Abbildung 3.44B), dies konnte direkt als Eingabe-Datei für ClustalX (*multisequence alignment program*) verwendet werden.

(A)

```

>gi141635|emb|X06373.1|ECCVRA1 E. coli gyrA gene for DNA gyrase A subunit
Length = 3227

Score = 829 bits (418), Expect = 0.0
Identities = 418/418 (100%)
Stands = Plus / Plus

Query: 1 ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactgg 60
Sbjct: 505 ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactgg 564

Query: 61 caacaagcctataaaaaatcgccctgctgcttgggtgactatggttaataccctccc 120
Sbjct: 565 caacaagcctataaaaaatcgccctgctgcttgggtgactatggttaataccctccc 624

Query: 121 catgctgactcgggggttatgacagcaatgctgcatgagcggcagcattctcctggct 180
Sbjct: 625 catgctgactcgggggttatgacagcaatgctgcatgagcggcagcattctcctggct 684

Query: 181 tacaatcgtggatgacggctgggttaacttggcttctatcgagcggcagcattctcctgg 240
Sbjct: 685 tacaatcgtggatgacggctgggttaacttggcttctatcgagcggcagcattctcctgg 744

Query: 241 atgctgtatacggaaatcctgctggcgaaaatgcccctgactgagccatctcgaa 300
Sbjct: 745 atgctgtatacggaaatcctgctggcgaaaatgcccctgactgagccatctcgaa 804

Query: 301 aaagagacggctgattcttctgataactatgacggcggaaaaaatccggagctcatg 360
Sbjct: 805 aaagagacggctgattcttctgataactatgacggcggaaaaaatccggagctcatg 864

Query: 361 caacaataaattctaacctgctggtgaaagcttctcctggtatgctgagtagtgg 410
Sbjct: 865 caacaataaattctaacctgctggtgaaagcttctcctggtatgctgagtagtgg 922

>gi11788555|gb|AE003312.1|AE003312 Escherichia coli K12 M1665 section
Length = 12231

```

(B)

```

>F.n111 K12
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi141635|emb|X06373.1|ECCVRA1 E. coli gyrA gene for DNA gyrase A subunit
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi11788555|gb|AE003312.1|AE003312 [download subject sequence spanning the
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi141635|emb|X06744.1|ECCVRA E. coli gyrA gene for DNA gyrase subunit A
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi141641|emb|X0174.1|ECCVRA1 E. coli gyrA gene for DNA gyrase subunit A
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi11798177|gb|D00854.1 [download subject sequence spanning the HSP] E. coli
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi141637|emb|X00544.1|ECCVRA4 Escherichia coli gyrA, putX & putY genes
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi112316165|gb|AE005453.1|AE005453 [download subject sequence spanning the
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi13548907|gb|AF052251.1|AF052251 Escherichia coli DNA gyrase A (gyrA) g
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi112316165|gb|AE005453.1 [download subject sequence spanning the HSP] E
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi11110043|gb|AF005494.1 Escherichia coli strain 110 DNA gyrase subunit
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi118389239|gb|AF005798.1 Escherichia coli strain 100 DNA gyrase subunit
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi118389237|gb|AF005797.1 Escherichia coli strain 90 DNA gyrase subunit
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi118389235|gb|AF005796.1 Escherichia coli strain 80 DNA gyrase subunit
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi118389233|gb|AF005795.1 Escherichia coli strain 70 DNA gyrase subunit
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi11110043|gb|AF005494.1 Escherichia coli strain 110 DNA gyrase subunit
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa
>gi118389239|gb|AF005798.1 Escherichia coli strain 100 DNA gyrase subunit
ggcttgagcgggtatcacctcgcttactttagccatgaagctactaggcaatgactggaaacaagcctataaa

```

Abbildung 3.44: Umformatieren der BLAST-Ausgabe in das ClustalX-Eingabe-Format mittels Parser. A: die Ausgabe-Datei der BLAST-Suche; B: die Eingabe-Datei für ClustalX.

3.4.3 Lokale Datenbank

Die Sequenz-Informationen der *missense* und stillen Mutationen wurden aus den öffentlichen Datenbanken extrahiert und in einer lokalen relationalen Datenbank (MySQL Datenbank) gespeichert. Diese Datenbank besteht aus mehreren Tabellen für die Mutationspositionen und einer Literaturtabelle für die relevanten Literaturangaben zur Chinolon-Resistenz. Jede Mutationstabelle enthält Informationen der möglichen Substitutionen sowohl auf der DNS-Ebene als auch auf der Aminosäure-Ebene.

Eine auf Web basierte graphische Benutzeroberfläche wurde mittels Perl, SQL und HTML implementiert, um eine Übersicht über die in der Datenbank gespeicherten Mutationsinformationen darzustellen (Abbildung 3.45). Solche Informationen ermöglichen das Sondendesign für die SNP-Positionen. Das dynamisch erzeugte HTML erlaubt ein automatisches Update. Auf der Webseite ist jede Mutation mit der zugehörigen Literaturangabe verknüpft, in der von dieser Mutation berichtet wurde. Die Anzahl der Literaturangaben, der Typ des Experimentes und die Kurzfassung können nach Bedarf angezeigt werden. Damit kann der Beitrag der Mutation zur Resistenz analysiert werden. Anhand dieser Informationen wurden die Sonden für *gyrA*- und *parC*-Array entworfen.

Quinolone resistance database for microarray analysis of *E. coli*

GyrA					
Asp82	Ser83	Ala84	Val85	Asp87	Ile89
Asp->Ala	Ser->Ala	Ala->Pro	Val(GTT)->Val(GTT)	Asp->Ala	Ile(ATI)->Ile(ATI)
Asp->Trp	Ser(TXX)->Ala(GXX)	Ala(TXX)->Pro(LXX)	-	Asp->Asn	-
Asp(GAC)->Gly(GGC)	Ser->Ile	-	-	Asp(GAC)->Asn(AAC)	-
-	Ser->Leu	-	-	Asp->Gln	-
-	Ser(TCG)->Leu(TTG)	-	-	Asp(GAC)->Gln(GGC)	-
-	Ser->Phe	-	-	Asp(GAC)->Gln(GGA)	-
-	Ser->Isp	-	-	Asp->His	-
-	Ser(TCG)->Trp(TGG)	-	-	Asp(GAC)->His(CAC)	-
-	Ser->Trp	-	-	Asp->Lys	-
-	Ser->Val	-	-	Asp->Ser	-
-	Ser(TXX)->Val(LXX)	-	-	Asp->Thr	-
-	-	-	-	Asp->Tyr	-
-	-	-	-	Asp(GAC)->Tyr(TAC)	-
-	-	-	-	Asp->Tle	-
-	-	-	-	Asp->Val	-
-	-	-	-	Asp(GAC)->Val(GTC)	-

Number of references 13 - page 1

To see an article, click its [Full Text] link.
 To review many abstracts, check the boxes to the left of the titles you want, and click the 'Get All Checked Abstract(s)' button.
 To see one abstract at a time, click its [Abstract] link.

1 2 [Next page](#)

Get all selected Abstract(s)

Oram M, Fisher LM.
4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of Escherichia coli clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction.
*Antimicrob Agents Chemother*1991 Feb35(2): 387-9[[Abstract](#)][[PDF](#)]
Type: Exp, Clinic

Heisig P, Schedletzky H, Falkenstein-Paul H.
Mutations in the gyrA gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of Escherichia coli.
*Antimicrob Agents Chemother*1993 Apr37(4): 696-701[[Abstract](#)][[PDF](#)]
Type: Exp, Clinic

Truong QC, Ouabdesselam S, Hooper DC, Moreau NJ, Soussy CJ.
Sequential mutations of gyrA in Escherichia coli associated with quinolone therapy.
*J Antimicrob Chemother*1995 Dec36(6): 1055-9[[Abstract](#)][[PDF](#)]
Type: Exp, Clinic

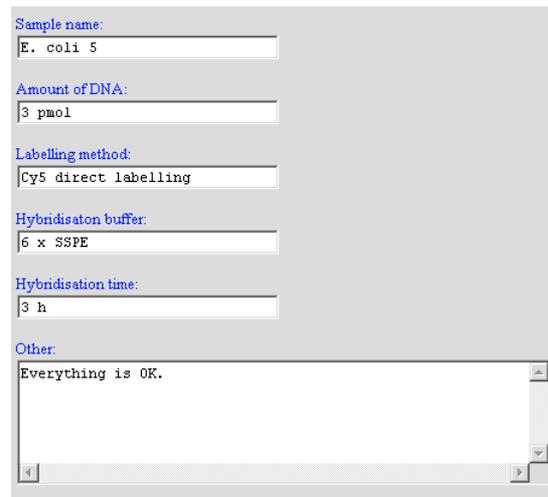
Lehn N, Stower-Hoffmann J, Kott T, Strassner C, Wagner H, Kronke M, Schneider-Brachert W.
Characterization of clinical isolates of Escherichia coli showing high levels of fluoroquinolone resistance

Abbildung 3.45: Lokale Datenbank mit Annotation der Resistenzinformation

3.4.4 Analyseprogramm

Eine automatisierte Analyse ist sehr wichtig für die klinische Routinediagnostik. Für diesen Zweck wurde ein Hilfsprogramm zur Analyse der Array-Daten entwickelt. Die ganze Prozedur umfasst drei Schritte: Laden der Daten, Datenanalyse und Ergebnisbericht. Die Programmiersprache ist Perl.

In Abbildung 3.46 sind einige Screenshots dargestellt. Im ersten Schritt kann der Benutzer das Arraylayout, das Fluoreszenzbild und die von der Auswertungssoftware (Imagen™) erzeugte Textdatei auf den Server laden. In zweiten Schritt werden die aufgeladenen Dateien durch ein auf dem Server liegendes CGI-Skript verarbeitet. Im oberen Teil der Analyseseite werden das Arraylayout und Fluoreszenzbild angezeigt. Die Intensitäten und deren Standardabweichungen der vier Kontrollensonden sowie der SNP-Sonden von verschiedenen Genotypen werden von diesem Hilfsprogramm berechnet und als HTML-Tabelle im mittleren Teil der Analyseseite angezeigt. Die PM-Intensität und das PM/MM-Verhältnis werden berechnet und am Ende jeder Tabelle dargestellt. Die entsprechende Aminosäure des PM wird mit den in der lokalen Literaturdatenbank gespeicherten relevanten Literaturdaten verknüpft. Dadurch kann



Sample name:
E. coli 5

Amount of DNA:
3 pmol

Labelling method:
Cy5 direct labelling

Hybridisation buffer:
6 x SSPE

Hybridisation time:
3 h

Other:
Everything is OK.

Abbildung 3.47: Labor Information Management System

3.4.6 Verifikation

Das Softwarepaket für die Mikroarray-Analyse wurde durch die Ergebnisse der Mikroarray-Experimente verifiziert. Anhand der in der lokalen Datenbank gespeicherten Resistenzinformation wurden die Sonden entworfen, die für die Detektion der Chinolon-Resistenz in klinischen Isolaten auf dem Mikroarray eingesetzt wurden. Die umfangreichen Daten aus den Mikroarray-Experimenten von mehr als 30 klinischen Isolaten wurden für die Verifikation des Mikroarray-Analyseprogramms verwendet. Die Programmzielsetzung konnte durch die erstellte Software umgesetzt werden.

4 Diskussion

Aufgrund des vermehrten Auftretens von Chinolon-resistenten klinischen Isolaten in den letzten Jahren⁴⁵, besteht ein dringender Bedarf nach einem schnellen Testverfahren für die Chinolon-Resistenz-Bestimmung in der klinischen Diagnostik. In dieser Arbeit wurde ein auf der Mikroarray-Methodik basierender Test (*gyrA*- und *parC*-Array) zum Nachweis der Chinolon-Resistenz auf molekularbiologischer Ebene für *E. coli* entwickelt. Der klinischen Anforderung entsprechend wurde das Testverfahren hinsichtlich der Sensitivität, Spezifität und Schnelligkeit optimiert. In diesem Kapitel werden die Eigenschaften und die Praxistauglichkeit dieses Verfahrens anhand der Untersuchungsergebnisse näher diskutiert und mit anderen Verfahren verglichen.

4.1 Vergleich der phänotypischen und genotypischen Resistenzbestimmung

Die konventionellen Methoden der Resistenzbestimmung, wie Agardiffusionstest, Mikrobouillondilutionstest oder E-Test, basieren auf der Kultivierung von Bakterien. Die phänotypische Bestimmung solcher Tests ist nicht ausreichend sensitiv und zeitaufwändig. Die Analyse kann von einem Tag bis zu mehreren Tagen in Anspruch nehmen, da sie vom Wachstum der Bakterien abhängig ist. In dieser Arbeit wurde ein schnelles genotypisches Testverfahren unter Verwendung der Mikroarray-Technologie zur Detektion der Chinolon-Resistenz in *E. coli* mit einer Testdauer von nur fünf (*gyrA*-Array) bzw. sechs (*parC*-Array) Stunden entwickelt. Zur Zeit benötigt dieses Verfahren noch gut ausgebildetes Personal, aufwändige technische Ausstattung wie Mikroarray-Spotter und -Scanner, sowie teure Verbrauchsmaterialien wie Fluoreszenzfarbstoff-markierte Nukleotide. Deshalb ist der Einsatz dieser Testverfahren in der Klinik noch nicht realisiert. Der Nutzen für den Patienten hinsichtlich der Testzeit und der daraus gewonnenen Informationstiefe ist jedoch eindeutig. Der phänotypische Test ist teilweise nicht sensitiv genug und die Mutations-tragenden *E. coli* Kolonien können übersehen werden. Solche Mutationen können dann wegen unsachgemäßen Chinolon-Gebrauchs selektiert und angereichert werden, was zu ernsthaften klinischen Auswirkungen führen kann. Um solche Mutationen frühzeitig zu erkennen, kann dieses genotypische Testverfahren zur Ergänzung der herkömmlichen phänotypischen Tests verwendet werden. Zusätzlich kann die genaue Kenntnis des Genotyps eines klinischen Isolats dabei helfen, die Quelle der Infektion und/oder den Hintergrund eines auftauchenden Resistenz-Phänomens in einer klinischen Einrichtung zu erkennen^{18,61,101}.

4.2 Vergleich der verschiedenen genotypischen Testverfahren

Einige genotypische Testverfahren zur Resistenzbestimmung von Chinolonen sind bereits vorhanden. Bereits 1989 war eine auf RFLP basierende analytische Methode zur Untersuchung der Punktmutationen in *E. coli gyrA* von Fisher et al. beschrieben³³ worden. 1998 entwickelten Bachoual et al. ein ähnliches Verfahren zur Überprüfung der

Punktmutationen in *E. coli parC*⁷. Die beiden Methoden nutzten eine vorhandene Schnittstelle eines Restriktionsenzym im entsprechenden Gen. Hierbei wurde das Restriktionsenzym *Hinfl* für *gyrA* und *Haell* für *parC* verwendet. Es ist offensichtlich, dass ein Basenaustausch innerhalb des zu untersuchenden Fragments ein anderes Restriktionsmuster als das des sensitiven Stammes verursachen kann, unabhängig davon, ob es sich um die Resistenz-relevante Mutationen handelt oder nicht. RFLP wird verwendet, um den Sequenzunterschied innerhalb einer spezifischen Restriktionsschnittstelle mittels einer Endonuklease zu detektieren. Es ist anzumerken, dass sowohl die *missense* Mutationen als auch die stillen Mutationen zu einem vom Wildtyp unterscheidbaren Restriktionsmuster führen können. Damit kann eine Interpretationsschwierigkeit entstehen.

1995 hatten Quabdesselam und seine Mitarbeiter einen SSCP-Test für die Analyse der Mutationen in *gyrA* und *gyrB* von *E. coli* entwickelt⁶⁶. Das Prinzip besteht darin, dass die Konformation einzelsträngiger DNS durch eine Punktmutation verändert werden kann. Dadurch verändert sich auch das Laufverhalten bei der Gelelektrophorese. Auch hier können alle Basenaustausche innerhalb des analysierten Fragments ein anderes Muster als das des sensitiven Stammes verursachen, unabhängig davon, ob es sich um die Resistenz-relevante Mutationen handelt oder nicht. Deswegen sollt das hierbei ermittelte Ergebnis noch einmal durch Sequenzierung bestätigt werden. Ohne Sequenzierung ist diese Methode nicht spezifisch genug, um Resistenz- verursachende *missense* Mutationen zu detektieren⁶⁶.

Eine MAMA-PCR-Methode zur Detektion der Punktmutationen in *gyrA* und *parC* von *E. coli* wurde 2002 von Yi et al. beschrieben⁷². Die Grundüberlegung bei einer MAMA-PCR ist, dass eine Fehlpaarung am 3' Ende eines Primers die Kettenverlängerungsreaktion der Polymerase verhindern kann. In der Arbeit von Yi wurde zusätzlich zur Base am 3' Ende noch eine fehlpaarende Base in der Nähe vom 3' Ende des Primers eingebaut, um die Spezifität der Methode zu erhöhen. Die Erhöhung der Spezifität ist aber mit einer Abnahme der Sensitivität verbunden. Entsprechend der Problematik der RFLP-Methodik, wird die Analyse unzuverlässig, sobald stammassoziierte stille Mutationen in der Nähe der *missense* Mutationen auftreten. In Folge dessen können Isolate, die zu anderen Genotypen gehören, nicht amplifiziert werden, was zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Ein Lösungsansatz hierfür ist die Etablierung einer Multiplex-PCR. In der Regel ist eine Multiplex-PCR aber weniger sensitiv und schwieriger zu handhaben.

Die Vorteile der Mikroarray-basierten Methoden gegenüber den oben genannten Methoden (SSCP, RFLP und MAMA) sind: (i) die entworfenen Sonden sind nur auf die Resistenz-relevanten Basenaustausche gerichtet. (ii) *E. coli* aus unterschiedlichen Genotypen können erfasst werden, und (iii) eine genaue Information hinsichtlich der Identität des ausgetauschten Nukleotids kann durch die Verwendung spezifischer Sonden ermittelt werden. Diese Information kann jedoch durch die oben erwähnten Methoden nicht erhalten werden. Im Fall von mikrobieller Antibiotika-Resistenz sind solche Informationen aber sehr wichtig.

Im letzten Jahr veröffentlichte die Arbeitsgruppe von Ng eine Arbeit über den Nachweis von Punktmutationen in *gyrA* und *parC* von *Neisseria gonorrhoeae* mittels Mikroarrays¹⁴. Für *E. coli*, einen der relevantesten Chinolon-resistenten Erreger, ist bisher jedoch noch kein ähnliches Verfahren entwickelt worden. Die hier vorgestellte Arbeit schließt diese Lücke. In der Arbeit von Ng wurden zwei Sonden pro SNP verwendet, im Gegensatz zu vier Sonden in unserer Methode. Die zwei zusätzlichen MM-Sonden für jede SNP-Position sorgten für eine bessere Robustheit des Systems.

Ein kurzes Zielfragment wurde sowohl bei der in dieser Arbeit beschriebene Methode (189 bp für *gyrA* und 264 für *parC*) als auch in der Arbeit von Ng verwendet (246 bp für *gyrA* und 384 für *parC*). Diese kurzen Fragmente ermöglichten den Einsatz unfragmentierter Ziel-DNS. In der hier vorliegenden Arbeit ist jedoch wegen starker Sekundärstrukturen für *parC* eine Fragmentierung notwendig. Als Ziel-DNS benutzte Ng ssDNS, die durch eine asymmetrische PCR hergestellt wurde. In der hier vorliegenden Arbeit wurde dsDNS verwendet, die durch eine „normale“ PCR hergestellt wurde. Obwohl die ssDNS schneller und besser mit der Sonden-DNS hybridisieren sollte, beeinträchtigte die asymmetrische PCR die Sensitivität des Tests erheblich. In der hier vorliegenden Arbeit lieferte die dsDNS nach 30 Minuten schon ein ausreichendes Signal unter Verwendung von aktiver Durchmischung während der Hybridisierung. Deshalb ist laut unserer Analyse auch ein kurzes doppelsträngiges DNS Fragment für die Hybridisierung an Einzelstrang- Oligonukleotidsonden geeignet. Ein weiterer Unterschied dieser zwei Methoden ist die Markierung. Ng benutzte eine indirekte Markierung. Zunächst wurde Aminoallyl-dUTP mittels PCR in die Ziel-DNS eingebaut. Die Markierung erfolgte durch die chemische Koppelung von aktivem Cy3 mit dem Aminoallyl-Rest. In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine direkte Markierung verwendet. Das Einbauen des Cy3-dCTP fand während der PCR statt, was zur Einsparung eines Reaktionsschrittes führt. Der Vorteil der indirekten Markierung gegenüber der direkten Markierung ist, dass das Polymerase störende Cy3 (großes Molekül) in der PCR nicht eingesetzt wird. Daher kann eine bessere Einbaurate des zu Markierungszwecken eingesetzten Nukleotids erzielt werden. Durch die Optimierung der PCR-Bedingungen, insbesondere des Verhältnisses zwischen dem nicht markierten und markierten dCTP, konnte in der hier vorliegenden Arbeit trotz direkter Markierung eine Einbaurate von 47 NT/Cy3 erreicht werden. Ein anderer Vorteil der indirekten Markierung ist, dass eine gleiche Einbaurate von Cy3 und Cy5 ermöglicht wird. Dies ist für die Expressionsanalyse interessant, aber für die Mutationsanalyse aufgrund der Verwendung nur eines Farbstoffes irrelevant. Ein weiterer Nachteil der indirekten Markierung ist die schwierige Handhabung der chemischen Koppelung sowie die Instabilität des aktiven Cyaninfloureszenzfarbstoffs. Eine Besonderheit in der Arbeit von Ng ist die Verwendung eines Referenzstamms (ein sensitives Isolat), der mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff (Cy5) markiert war als das zu untersuchendem Isolat (Cy3). Der mit Cy5 markierte Referenzstamm diente als eine interne Kontrolle. Dagegen übernahm in der hier vorliegenden Arbeit die Prozesskontroll-Sonde diese Aufgabe.

4.3 Sequenzanalyse und Sondendesign

Die Chinolon-Resistenz in *E. coli* ist weitgehend untersucht. Bereits in achtziger Jahren hatten Fischer²⁴, Hooper⁴¹ und andere Forscher angefangen, die Ursache dieser Resistenz auf molekularbiologischer Ebene ausfindig zu machen. Bisher sind mehr als 100 Veröffentlichungen auf diesem Gebiet publiziert worden. Nur ein kleiner Teil davon verfügt über die Sequenzinformation auf Nukleotid-Ebene, die für das Sondendesign notwendig ist. In den meisten Publikationen wurden nur die Aminosäure-Substitutionen beschrieben. Die GenBank ist eine gute Quelle für Nukleotidsequenzen. Jedoch tragen die dort aufgenommenen Sequenzen meist keine Mutationen. Für das Sondendesign mussten diese zwei Informationsquellen kombiniert werden. Zu diesem Zweck wurde eine lokale Datenbank in dieser Arbeit aufgebaut, die solche Informationen speichert und für das Sondendesign zur Verfügung stellt. Zusätzlich

wurden auch die Sequenzen, die aus eigener Sequenzierung der klinischen Isolate stammten, aufgenommen.

4.3.1 Bedeutung von verschiedenen Genotypen

Nach einer genauen Analyse aller oben genannten Informationen wurden Position 83 und 87 in *gyrA* bzw. Position 80 und 84 in *parC* als die *hotspots* der Chinolon-Resistenz identifiziert. Es gab zwar auch Berichte über *missense* Mutationen an anderen Positionen innerhalb der QRDR, wie z.B. Position 67, 81, 82, 84 und 106 in *gyrA* sowie Position 78 und 81 in *parC*, aber solche Mutationen wurden erst ein bis zwei mal beschrieben. Daher hatten sie bislang nur eine geringe klinische Bedeutung. Um alle diese Positionen abdecken zu können, werden mehr als 1000 Sonden benötigt, da die Positionen sehr dicht neben einander liegen. Deswegen wurden die *gyrA*- und *parC*-Arrays nur auf das Wesentliche komprimiert.

Es wurde außer *missense* Mutationen auch stille Mutationen in der QRDR gefunden, wie z.B. Position 85, 89, 91, 100 und 102 in *gyrA*, sowie Position 77, 79, 80, 82, 87 und 91 in *parC*. Diese stillen Mutationen haben zwar keine Auswirkung auf die Resistenz, aber sie befinden sich innerhalb des Sondenbereiches. Es ist sehr interessant, dass einzelne stille Mutationen nur im Kontext eines kompletten stille-Mutations-Satzes immer zusammenhängend vorkamen. Eine Erklärung hierfür ist, dass solche stille Mutationen vor langer Zeit stattgefunden hatten. Die Urstämme solcher stille Mutationen hatten die Sequenzinformationen an ihre Nachkommen weitergegeben. Deshalb wurden sie in dieser Arbeit auch Stamm-spezifische stille Mutationen genannt, worauf die unterschiedlichen Genotypen zurückzuführen sind. Warum nur die mehrfachen stillen Mutationen und nicht die einzelne stille Mutation stattgefunden hatten bzw. weitergegeben wurden, bleibt ungeklärt. Aufgrund der stillen Mutationen wurden mehrere Sondensätze für eine *missense* Mutationsposition entworfen, um die verschiedenen Genotypen abzudecken. In der Arbeit von Ng wurden auch Mehrfachsonden für einige Positionen entworfen, um stille Mutationen in den benachbarten Positionen zu berücksichtigen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden dafür ganzen Sondensätze verwendet: zwei Sätze für *gyrA*/Position83 und vier Sätze für *gyrA*/Position87 sowie vier Sätze für *parC*/Position80 und zwei Sätze für *parC*/Position84. Obwohl die stillen Mutationen nicht in der Mitte der Sonden lagen, wurden die Hybridisierung trotzdem gestört, besonders wenn sich mehrere solcher Mutationen in einer Sonde befanden (vgl. Abschnitt 3.1.3 und 3.2.2). Daher sind für eine sichere Detektion einer *missense* Mutation die Mehrfachsonden unverzichtbar. Da innerhalb der *gyrA*/Position87 sowohl die erste als auch die zweite Base mutiert werden kann, wurden dafür sieben Sonden pro Satz entworfen, die sich um eine Base oder zwei Basen unterscheiden. Daher gibt es für jede PM-Sonde sechs MM-Sonden statt drei für die normale SNP-Detektion. Es ist anzumerken, dass die Sonden mit zwei MMs geringere Intensitäten zeigten als die Sonden mit nur einem MM (Vgl. Abschnitt 3.1.3).

4.3.2 Eigenschaften der Sonden

Die unterschiedliche Hybridisierungseffizienz der verschiedenen Sonden ist ein großes Problem bei der Entwicklung eines Mikroarrays^{16,82}. Bei der sequenzabhängigen Hybridisierung spielt die Basenzusammensetzung der Sonden eine sehr wichtige Rolle, wie Southern in seiner Publikation ausführlich beschrieben hatte⁸³. Deshalb ist beim Sondendesign empfehlenswert, dass alle Sonden möglichst die gleiche Länge, den gleichen GC-Gehalt und den gleichen Tm-Wert besitzen. Der Regel zufolge sind alle in

dieser Arbeit entworfenen Sonden 19 Basen lang und haben einen T_m-Wert von zwischen 49°C und 53°C (*gyrA*-Array) bzw. zwischen 51°C und 58°C (*parC*-Array).

Da Sekundärstrukturen der Sonden die Hybridisierung verhindern können^{57,58}, sollen *hairpin*- und Dimer-Strukturen beim Sondendesign vermieden werden. Dies wurde auch in dieser Arbeit berücksichtigt. Die *gyrA*-Sonde mit der stabilsten Sekundärstruktur hat einen ΔG -Wert von -2.4 kcal/mol (siehe Tabelle 3.3). Im Gegensatz dazu gehört die Sonde mit einem ΔG -Wert von -2.4 kcal/mol im *parC*-Array (ASOH) bereits zu den besseren Sonden (siehe Tabelle 3.9). Die *parC*-Sonde (ASOH) mit der stabilsten Sekundärstruktur besitzt einen ΔG -Wert von -16.6 kcal/mol. Nach der Berechnung von Software Array Designer werden die Sonde, die eine Sekundärstruktur mit einem ΔG -Wert kleiner als -3 kcal/mol besitzt, für ungeeignet für das Mikroarray-Experiment eingestuft. Die Experimentdaten in dieser Arbeit bestätigten diese Festlegung. Die Sonde (E.coli_ParC80T2) mit einem ΔG -Wert von -16.6 kcal/mol zeigte kein Signal bzw. ein sehr schwaches Signal nach der Hybridisierung. Da die Intensität dieser Sonde geringer als die der MM-Sonden war, kann das PM nicht richtig identifiziert werden. Wegen der Lage der Mutationen war ein anderer Entwurf nicht möglich. Als Alternative wurde die ASPE-Methode verwendet. Da die SNP-Position am 3'-Ende (ASPE-Sonde) statt in der Mitte (ASOH-Sonde) liegt, wurde der Sondenbereich um neun Basen verschoben. Dadurch wurde der ΔG -Wert der Sonde E.coli_ParC80T2 um das sechsfache auf -2.8 kcal/mol verbessert (siehe auch Tabelle 3.10). Um die Hybridisierungseffizienz der entworfenen ASPE-Sonden zu überprüfen, wurde zunächst eine Hybridisierung mit der markierten Ziel-DNS durchgeführt. Das Hybridisierungsergebnis zeigte eine viel höhere Intensität im Vergleich zur ASOH-Sonde. Bemerkenswert ist, dass alle Sonden für Position 80 niedrigere Intensitäten als die Sonden für Position 84 hatten. Ein näherer Blick auf die Sonden zeigt, dass die Sonden für Position 80 einen niedrigeren ΔG -Wert als die Sonden für Position 84 haben. Dies deutet auf eine stabilere Sekundärstruktur hin.

Genau wie die Sonden-DNS, kann auch die Ziel-DNS eine Sekundärstruktur bilden. Dadurch wird die Ziel-DNS unzugänglich für die Sonden-DNS und die Hybridisierung wird ebenfalls gestört. Um Sekundärstrukturen der Ziel-DNS zu zerstören, wird normalerweise Fragmentierung eingesetzt⁶². Die Überlegung dabei ist, dass die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer Sekundärstruktur bei einer kurzen Sequenz geringer als bei einer langen Sequenz ist. Verschiedene Fragmentierungsmethoden, wie chemische^{53,91}, mechanische⁷⁸ und enzymatische³, wurden dafür verwendet. In dieser Arbeit erfolgte die Fragmentierung der Ziel-DNS mit DNase I. Die DNase I, die zu den Endonukleasen gehört, schneidet unspezifisch Phosphodiesterbindungen der DNS⁵⁶. Dadurch entstehen mehrere kurze Fragmente aus einer langen DNS-Kette. Die Länge der Fragmente kann durch die Menge des eingesetzten Enzyms oder durch die Fragmentierungszeit eingestellt werden. Ein zu langes Fragment kann immer noch eine Sekundärstruktur bilden und dabei die Hybridisierung stören. Ein zu kurzes Fragment kann zu wenige Markierungen oder gar keine tragen, und somit eine Kompetition zwischen unmarkierten und markierten Fragmenten auftreten und damit die Sensitivität des Arrays reduziert werden. Weiterhin kann die Hybridisierung wegen eines zu niedrigen T_m-Werts unmöglich werden. Die für die Hybridisierung optimale Fragmentlänge muss empirisch ermittelt werden. Die Fragmentierung des *parC*-Fragments zeigte eine positive Wirkung auf die Hybridisierung. Die Sonden für Position 80 zeigten bei der Ziel-DNS mit Fragmentierung Intensitäten von ca. 10000, während die gleichen Sonden bei der Ziel-DNS ohne Fragmentierung kein detektierbares Signal zeigten (siehe Abbildung 3.34).

Aber trotz der Verbesserung durch die Fragmentierung sind die Intensitäten der Sonden für Position 80 immer noch schwächer als die der Sonden für Position 84. Der Grund kann auf der Sondenseite liegen. Die Fragmentierung des *gyrA*-Fragments führte nicht zur erwarteten Erhöhung der Intensität, sondern zu einer geringfügigen Absenkung. Eine Erklärung dafür ist die geringere Sekundärstruktur des *gyrA*-Fragments. Die unfragmentierte Ziel-DNS kann bereits gut mit der Sonden-DNS hybridisieren. Das fragmentierte kurze Fragment trägt nicht mehr so viel zu einer besseren Hybridisierung bei. Im Gegensatz verursachte es wegen der geringeren Anzahl an Cy3-Molekülen eine Abnahme der Intensität.

Außer den oben genannten Parametern, gibt es noch andere wenig gut charakterisierte Faktoren, die die Hybridisierung beeinflussen können. Der *gyrA*-Array ist ein gutes Beispiel hierfür. Obwohl die Sonden für Position 83 und die Sonden für 87 ähnliche T_m -Werte und Gibb'sche freie Energien der Sekundärstruktur besitzen (siehe Tabelle 3.3), hatten die Sonden für Position 83 wesentlich höhere Intensitäten als die Sonden für Position 87. Selbst durch die Fragmentierung wurde dieser Effekt nicht aufgehoben. Offensichtlich hängt die Hybridisierungseffizienz nicht nur von der hybridisierten Sequenz ab, sondern auch von der benachbarten Sequenz in der Ziel-DNS. Bisher ist es noch nicht möglich das genaue Hybridisierungsverhalten einer bestimmten Sequenz vorherzusagen⁸². In der Regel müssen die entworfenen Sonden durch Hybridisierungsexperimente empirisch untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden eine PM-Sonde und drei bzw. sechs MM-Sonden pro SNP-Position eingesetzt. Die PM-Sonde zeigte wie erwartet immer die höchste Intensität. Die Intensitäten der MM-Sonden waren unterschiedlich, je nachdem welche Fehlpaarung vorlag. Ludwig *et al.* hatten in ihrer Veröffentlichung berichtet⁵⁴, dass A-A, A-C, C-C, C-T und T-T Fehlpaarung eine stärkere störende Wirkung auf die Hybridisierung als A-G, G-G und G-T Fehlpaarung haben. Ein ähnliches Phänomen wurde auch bei dem *gyrA*-Array beobachtet. Zum Beispiel ist die Perfektpaarung für Position 83 beim sensitiven *E. coli* (*E. coli* 1) eine G-C Bindung. Innerhalb der drei Fehlpaarungen (G-A, G-T, G-G) besitzt die G-T Fehlpaarungen die höchste Intensität (Abbildung 3.6D).

4.4 Array-Optimierung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines diagnostischen DNS-Mikroarrays. Das Anwendungsgebiet dieses DNS-Mikroarrays liegt in der klinischen Mikrobiologie. Für diesen Zweck müssen die Sensitivität, die Spezifität, die Schnelligkeit und die Kosten des Verfahrens berücksichtigt werden. In dieser Arbeit wurden die Parameter untersucht, die einen Einfluss auf diese Faktoren haben können. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Markierungs-PCR, die Hybridisierung und die Primer-Extensions-Reaktion. Diese drei Schritte sind in der Mikroarray-basierten DNS-Analyse die Zeit- bzw. Sensitivitäts-limitierenden Schritte. Obwohl die in dieser Arbeit optimierten Bedingungen für die Markierungs-PCR, die Hybridisierung und die Primer-Extensions-Reaktion wegen der unterschiedlichen Eigenschaft der Ziel-DNS und des unterschiedlichen Verhaltens der Sonden-DNS nicht unbedingt für alle Anwendungen geeignet sind, sind solche Bedingungen ein guter Ausgangspunkt für weitere Optimierungen einer neuen Mikroarray-Anwendung.

4.4.1 Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Markierungs-PCR

Die DNS-Ausbeute und die Einbaurate der Markierungs-PCR sind für die Sensitivität des Arrays verantwortlich. Unterschiedliche Parameter, wie Annealing-Temperatur, Anzahl der Zyklen, Mg^{2+} Konzentration, Verhältnis zwischen nicht markiertem und markiertem dCTP und Menge der *Taq* Polymerase, hatten unterschiedliche Auswirkungen auf die DNS-Ausbeute und Einbaurate. Einige Parameter, wie Menge der *Taq* Polymerase, beeinflussten die beiden Faktoren in gleichen Richtung. Anderen Parameter, wie Verhältnis zwischen nicht markiertem und markiertem dCTP, hatten eine entgegengesetzte Wirkung. In diesem Fall musste ein Kompromiss geschlossen werden, um die Auswirkungen auf diese beiden Faktoren auszugleichen. Außerdem gab es auch Parameter, die nur einen Faktor (DNS-Ausbeute oder Einbaurate) beeinflussten, wie Anzahl der Zyklen bzw. Mg^{2+} Konzentration. Da die Kosten eine sehr wichtige Rolle bei der klinischen Anwendung spielen, wurde eine suboptimale Bedingung für das Verhältnis zwischen nicht markiertem und markiertem dCTP ausgewählt, um die Verfahrenskosten zu senken.

Die Experimente zeigten, dass die Annealing-Temperatur und die Anzahl der Zyklen keinen großen Einfluss auf die Einbaurate hatten. Hinsichtlich der DNS-Ausbeute hatten die zwei Parameter aber eine Auswirkung. Wie erwartet führte eine zu hohe Annealing-Temperatur zu einer Abnahme der DNS-Ausbeute, während die zunehmende Anzahl der Zyklen zu einer Zunahme führte. Mit einer zunehmenden Mg^{2+} Konzentration und einer zunehmenden Menge von *Taq* Polymerase erhöhte sich die Einbaurate, aus einem noch nicht geklärten Grund. In Bezug auf die DNS-Ausbeute hatten die zwei Parameter einen positiven Effekt. Mehr Polymerase erzeugte wie erwartet mehr PCR-Produkt, während eine zunehmende Mg^{2+} Konzentration diese Erwartung nicht erfüllte. Außerdem wurde unspezifisches PCR-Produkt bei der hohen Mg^{2+} Konzentration beobachtet. Durch eine Erhöhung des markierten dCTP-Anteils in der PCR verringerte sich die DNS-Ausbeute. Die Ursache hierfür ist, dass das große Cy-Molekül die PCR stört. Der zunehmende Anteil des Cy-Moleküls führte aber gleichzeitig zu einer besseren Einbaurate. Dieses Phänomen wurde bereits in der Applikations-Note von *Molecular Dynamics*⁵⁹ beschrieben.

4.4.2 Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Hybridisierung

Die Spezifität und die Sensitivität der auf Hybridisierung basierenden Methode hängen stark von der Basenzusammensetzung und den Hybridisierungsbedingungen ab. Da der Sequenzkontext um die SNPs festgelegt sind, gibt es wenig Spielraum beim Sondendesign. Deswegen zielte diese Arbeit auf die Optimierung der Hybridisierungsbedingungen für den *gyrA*-Array. Unterschiedliche Parameter, wie Hybridisierungstemperatur, Hybridisierungszeit, Einbaurate der Ziel-DNS, Art des Fluoreszenzfarbstoffs und Länge des Poly-dT-Abstandhalters, hatten unterschiedliche Auswirkungen auf die Spezifität und die Sensitivität des Verfahrens.

Für die beiden Positionen (83 und 87) wurde eine höhere Spezifität, aber eine niedrigere Sensitivität mit steigender Hybridisierungstemperatur von 35°C bis 55°C beobachtet. Bei einer Temperatur von 55°C war die PM-Intensität unterhalb des *cut-off*-Wertes von 300. Eine Verbesserung der Spezifität und der Sensitivität konnten durch eine verlängerte Hybridisierungszeit von einer Stunde bis zu sieben Stunden erreicht werden. Eine Hybridisierungszeit von 24 Stunden führte zu einer Verringerung der Sensitivität. Dies ist vermutlich auf das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs wegen der langen Hybridisierungszeit bei 45°C zurückzuführen. Eine hohe Einbaurate

verbesserte deutlich die Sensitivität des Verfahrens. Keinerlei *quench*-Effekt wurde beobachtet, selbst bei einer Einbaurrate von 47 NT/Cy5, der besten Einbaurrate in dieser Arbeit. Ein sehr erstaunliches Ergebnis ist die siebenfach bzw. 20fach erhöhte Sensitivität der Cy3-Markierung gegenüber der Cy5-Markierung für Position 83 bzw. Position 87. Die Ursache liegt vermutlich in der unterschiedlichen Leistung der zwei Laser des Array-Scanners. Der Poly-dT-Abstandhalter erhöhte die Sensitivität. Dieses Ergebnis stimmte mit den Ergebnissen der Veröffentlichung von Southern⁸² überein. In dieser Publikation führte Southern dieses Phänomen auf die bessere Zugänglichkeit der auf der Festoberfläche immobilisierten Sonden zurück.

Im allgemeinen waren die Intensitäten der auf Position 83 gerichteten Sonden höher als die der auf Position 87 gerichteten Sonden. Die Ursache liegt vermutlich am unterschiedlichen Sequenzkontext dieser beiden Positionen. Es ist eine bekannte Tatsache für die auf Hybridisierung basierende Methoden, dass Sonden mit unterschiedlichen Sequenzen ein unterschiedliches Hybridisierungsverhalten haben^{11,75,83}. Obwohl die Hybridisierungseffizienz durch die Hybridisierungsbedingungen wie z.B. Temperatur und Salzkonzentration eingestellt werden kann, muss bei der herkömmlichen Hybridisierungsmethode die gleiche Hybridisierungsbedingung für alle Sonden eingesetzt werden, weil die Hybridisierung innerhalb eines Reaktionsraums stattfindet. Bei einem alternativen Hybridisierungsverfahren, das den Hybridisierungs- und Waschvorgang elektronisch steuert, ist es möglich eine optimale Bedingung für jede Sonde individuell einzusetzen^{29,81}.

Die zusätzlichen Fehlbasenpaarungen der stillen Mutationen in der dritten Position (3' Ende) der auf Position 83 gerichteten Sonden und in der zweiten (3' Ende) und sechsten (5' Ende) Position der auf Position 87 gerichteten Sonden verringerten die Stabilität des DNS-Hybrids. Obwohl dieser destabilisierende Effekt nicht so groß war, wie der von der in der Mitte der Sonde liegenden Fehlbasenpaarung³⁴, konnten die unterschiedlichen Genotypen von einander unterschieden werden. Der Diskriminierungsfaktor war jeweils 1.3 bzw. 15 für Position 83 bzw. Position 87.

Die Universalsonden, die in den zukünftigen Anwendungen die spezifischen Sonden ersetzen sollen, zeigten ein deutlich niedrigeres Signal im Vergleich zu den spezifischen Sonden. Dies ist vermutlich auf die geringere Stabilität des DNS-Hybrids zurückzuführen. Die Basenpaarung zwischen dem Inosin und den natürlichen Basen ist weniger stabil wie die zwischen natürlichen Basen (A:T und G:C)⁵⁵. Ein anderer Nachteil bei der Verwendung von Inosin als Universalbase ist die unterschiedliche Paarungseffizienz mit verschiedenen Basen. In der Arbeit von Bergstrom wurde gezeigt, dass Inosin Paarungen mit G eher bevorzugt als mit C¹². Als Alternative können andere Basenanaloga als Universalbase dienen, wie z.B. Nitroindol. Hinsichtlich der Stabilität des DNS-Hybrids und der Diskriminierung zwischen den natürlichen Basen ist 5-Nitroindol besser geeignet als eine Universalbase⁵². Bisher gibt es noch keinen kommerziellen Anbieter für dieses Produkt, was die Möglichkeit der Verwendung stark begrenzt. Für den *gyrA*- und *parC*-Array werden in Zukunft die spezifischen Sonden bevorzugt, die außer ihrer Stabilität der Basenpaarung noch zusätzliche Informationen über die *E. coli* Genotypen für eine epidemiologische Untersuchung liefern können.

4.4.3 Vergleich verschiedener Hybridisierungsmethoden

Für den *gyrA*-Array wurde zunächst die statische Hybridisierungsmethode verwendet. Die Hybridisierung fand unter einem Deckglas statt. Diese

Hybridisierungsmethode ist nachteilig in Bezug auf die Signalintensität und die Reproduzierbarkeit wegen des begrenzten Mischens der Ziel-DNS unter dem Deckglas. Deswegen wurden 4 pmol Ziel-DNS und drei Stunden Hybridisierungszeit benötigt. Die Standardabweichungen sowohl innerhalb eines Arrays als auch zwischen verschiedenen Arrays waren sehr groß. Durch die Verwendung eines aktiven Mischsystems, das die Ziel-DNS während der Hybridisierung durchmischte, wurde der Hybridisierungsprozess verbessert. Die Sensitivität des Verfahrens wurde durch die Verwendung von Mischsystem im Vergleich zur manuellen Hybridisierung wesentlich erhöhte. Hinsichtlich der Sensitivität war der Thermomixer besser geeignet, während hinsichtlich der Spezifität die Tecan bessere Ergebnisse lieferte. Die höhere Spezifität ist auf das aktive Waschen bei der Tecan zurückzuführen. Im Vergleich zur Tecan verfügt der Thermomixer über keine Einheit zum Waschen. Daher musste das Waschen manuell durchgeführt werden. Meiner Ansicht nach ist der Thermomixer ein Gerät mit einem sehr guten Leistung/Kosten-Verhältnis für Mikroarray-Experimente im Labor. In der Applikations-Note von Tecan⁸⁶ wurde die manuelle Hybridisierung mit der automatisierten Hybridisierung in Bezug auf die Homogenität und Reproduzierbarkeit verglichen. Das Ergebnis zeigte, dass im Gegensatz zur manuellen Hybridisierung durch die Verwendung der Tecan Hybridisierungsstation eine bessere Reproduzierbarkeit erzielt wurde. Bislang gibt es keine Publikation über den Vergleich hinsichtlich der Signal-Intensität zwischen verschiedenen Hybridisierungsmethoden, welche in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Die Sensitivität wurde unter der Verwendung der optimierten Bedingungen und der Hybridisierungseinrichtung (Thermomixer) ermittelt. Eine Ziel-DNS-Menge von 0.125 pmol konnte innerhalb der Hybridisierungszeit von 10 Minuten detektiert werden. Für eine sichere Identifikation einer unbekanntes klinischen Probe sind jedoch eine Ziel-DNS von 0.25 pmol und eine Hybridisierungszeit von 30 Minuten zu empfehlen. Im Vergleich zur manuellen Hybridisierung, wobei eine Ziel-DNS-Menge von 4 pmol und eine Hybridisierungszeit von drei Stunden verwendet wurde, war durch den Einsatz des Thermomixers eine sechsfach höhere Sensitivität innerhalb eines Bruchteils der Hybridisierungszeit erzielt worden. Eine ähnliche Hybridisierungszeit (30 min) wurde in Arbeit von Yershov et. al.⁹⁹ verwendet, wobei viel mehr Ziel-DNS (1 pmol) benötigt wurde. In der Arbeit von Ronald et. al.⁸¹ wurde eine Methode beschrieben, die das elektrische Feld für die Hybridisierung benutzte. Durch diesen aktiven Hybridisierungsprozess konnte die Hybridisierungszeit bis zu 15 Sekunden reduziert werden.

4.4.4 Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Primer-Extensions-Reaktion

Einige Protokolle von ASPE auf einer festen Phase wurden bei unterschiedlichen Arbeitsgruppen etabliert. Für die Primer-Extensions-Reaktion waren unterschiedliche Enzyme wie Reverse Transkriptase⁶⁸, *Klenow* DNS Polymerase^{2,64} oder *Taq* Polymerase³⁰ im Einsatz. Alle diese Protokolle erforderten ein einzelsträngiges DNS-Template für die Primer-Extensions-Reaktion. Diese einzelsträngige Template-DNS konnte durch eine asymmetrische PCR³⁰, durch die Verwendung eines normalen und eines Phosphothioate (PTO)-modifizierten³⁰ bzw. biotinylierten Primers³⁰ oder durch die Verwendung eines Primers mit der Promotersequenz der RNA-Polymerase erzeugt werden⁶⁸. Alle diese Verfahren setzten entweder die Sensitivität des Verfahrens herab oder führten einige zusätzliche zeitaufwändige und arbeitsintensive Schritte ein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein modifiziertes, neues Protokoll etabliert, das die

Verwendung von doppelsträngiger Template-DNS ermöglichte. Dadurch ist die Zeit- und die Kostenfaktor erheblich reduziert worden.

Um die Sensitivität und die Spezifität zu erhöhen, wurde die Parameter untersucht, wie dNTP-Konzentration, Temperatur der Primer-Extensions-Reaktion, Zeit der Primer-Extensions-Reaktion, Menge der Polymerase, Fragmentierung und Menge der Ziel-DNS, die einen Einfluss auf diese zwei Faktoren haben können. Mit einer zunehmenden dNTP-Konzentration nahm die Effizienz der Primer-Extensions-Reaktion zu, während die Diskriminierung abnahm. Die Abnahme der Diskriminierung mit einer zunehmenden dNTP-Konzentration wurde auch für die Allel-spezifische PCR berichtet⁴². Die optimale Reaktionstemperatur der *Taq* Polymerase bzw. die Hybridisierungstemperatur ist jeweils 72°C bzw. 45 °C. Eine zu hohe Temperatur führt zur Dissoziation des Hybrids. Eine zu niedrige Temperatur stört die Enzymaktivität. Gemäß den experimentellen Ergebnissen hatte die Temperatur keine große Wirkung auf die Effizienz der Primer-Extensions-Reaktion der PM-Sonden. Dagegen verringerten sich die Intensitäten der MM-Sonden mit einer zunehmenden Temperatur erheblich. Die unveränderten PM-Intensitäten und die verringerten MM-Intensitäten führten zu einer signifikanten Zunahme der Spezifität. Eine zunehmende Menge der *Taq* Polymerase begünstigte sowohl die Effizienz der Primer-Extensions-Reaktion der PM-Sonden als auch der MM-Sonden. Die Fragmentierung der Ziel-DNS hatte einen deutlich positiven Effekt auf die auf Position 80 gerichteten Sonden. Dies kann durch die Zerstörung der starken Sekundärstrukturen in diesem Bereich erklärt werden. Unter der Verwendung des optimierten Protokolls konnte 0.125 pmol Ziel-DNS innerhalb einer Primer-Extensions-Zeit von 30 Minuten detektiert verwenden.

4.5 Verschiedene Plattformen der Array-basierten SNP-Detektion

Es gibt verschiedene Plattformen für die Array-basierte SNP-Detektion, wie z.B. Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung (ASOH)⁹³, Einzelbasen-Primer-Extension⁶⁷, Allel-spezifische Amplifikation² oder Allel-spezifische Oligonukleotid-Ligation³⁶. Für den *gyrA*-Array wurde die ASOH-Methode verwendet. Aufgrund ihrer robusten Leistung und der minimalen Verarbeitungsschritte ist diese Methode besonders geeignet für die klinischen Anwendungen. Selbstverständlich war die ASOH-Methode auch die erste Wahl für den *parC*-Array.

Jedoch hatte sich diese Methode wegen der stabilen Sekundärstruktur der Sonden als ungeeignet für den *parC*-Array herausgestellt. Eine alternative Methode musste verwendet werden, die einen anderen Sequenzteil als Sonde nutzte. Obwohl hier einige Methoden zur Verfügung stehen, wie z.B. die Einzelbasen-Primer-Extension⁶⁷ oder Allel-spezifische Oligonukleotid-Ligation³⁶, wurde die Allel-spezifische Primer-Extension (ASPE) gewählt. Der Grund hierfür sind die relativ niedrigen Kosten hinsichtlich der zusätzlichen Ausrüstung und des Verbrauchsmaterials im Vergleich zu den anderen zwei Methoden. Obwohl ein kommerzielles System (APEX: *arrayed primer extension*) für die Einzelbasen-Primer-Extension^{46,90} vorhanden ist, werden in diesem System ein Vierkanal-Scanner und vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nukleotide benötigt. Deswegen wurde diese Methode in dieser Arbeit nicht benutzt. Im Vergleich dazu erfordert die in dieser Arbeit verwendete ASPE-Methode nur einen Einkanal-Scanner und ein markiertes Nukleotid. Es ist offensichtlich, dass die Kosten des Verfahrens dadurch gering gehalten werden. Außerdem können mehrere markierte Nukleotide anstatt eines einzigen (wie bei APEX) während der Primer-Extensions-Reaktion eingebaut werden, was wiederum zur

Verbesserung der Sensitivität führen kann. Obwohl unterschiedliche Plattformen für den *gyrA*-Array (ASOH) und den *parC*-Array (ASPE) verwendet worden waren, konnten die beiden Arrays vereinigt werden. Das vereinigte System ermöglichte die gleichzeitige Detektion von Mutationen in den beiden Genen (*gyrA* und *parC*).

4.6 Mischung und Realproben

Außer einer kurzen Analysezeit, die für die klinische Anwendung wichtig ist, müssen weitere Situationen berücksichtigt werden, die häufig in der klinischen Routinediagnose auftreten. Eine solche Situation ist die Koinfektion von sensitiven und resistenten Krankheitserregern. Ein anderes Problem ist das Vorhandensein einer geringen Menge des Krankheitserregers in einem frühen Krankheitsstadium. Die erfolgreiche Identifikation der resistenten Isolate in diesen zwei Problemfällen erfordert ein Verfahren mit einer hohen Spezifität und Sensitivität. Die entwickelten Arrays sind hinsichtlich dieser zwei Aspekte optimiert. Unterschiedliche Parameter wurden untersucht, die einen Einfluss auf die Spezifität und die Sensitivität des Systems haben.

Die Sensitivität des optimierten Assays wurde mit aufgestockten Urinproben evaluiert. Die Detektionsgrenze liegt bei 100 CFU/ml für *gyrA* und 1000 CFU/ml für *parC*. Die höhere Sensitivität des *gyrA*-Arrays gegenüber dem *parC*-Array liegt an dem PCR-Schritt. Das PCR-Ergebnis zeigte, dass das *gyrA*-Fragment mit einer höheren Effizienz als das *parC*-Fragment amplifiziert werden konnte. Die meisten publizierten Mikroarray-Arbeiten verfügten nicht über solche Daten. Daher ist ein Vergleich nicht möglich.

Um die Fähigkeit des Verfahrens zur Detektion des resistenten *E. coli* in Anwesenheit von sensitiven *E. coli* zu untersuchen, wurden sensitive *E. coli* mit resistenten *E. coli* in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Die Nachweisgrenze für *gyrA* entspricht ein Mischverhältnis von 1:1 bis zu 10:1 (sensitive *E. coli* : resistente *E. coli*). Die Nachweisgrenze für *parC* entspricht einem Mischverhältnis von 10:1. Die höhere Nachweisgrenze des *parC*-Arrays (ASPE) gegenüber dem *gyrA*-Array (ASOH) ist auf die bessere Diskriminierung zwischen PM und MM der *Taq* Polymerase² zurückzuführen. Doch selbst die Nachweisgrenze von 10:1 erfüllt die klinischen Anforderungen nicht. Daher ist die Entwicklung neuer Methoden (wie z.B. *allele-specific ligase detection reaction*: LDR) für die Array-basierte SNP-Detektion mit einer höheren Diskriminierungskraft notwendig. In der Publikation von Wang et. al.⁹⁵ wurde die LDR in Kombination mit der Mikrofluid-Technologie zur Detektion von keiner Menge der Mutanten-DNS verwendet. Laut des Ergebnisses konnte eine Punktmutation in dem *k-ras* Onkogene bei einer Anwesenheit von 100000fachen Überschuss an Wildtyp-Sequenzen detektiert werden.

4.7 Klinische Isolate

Alle 36 untersuchten *E. coli* Isolate (hinsichtlich der Mutationen in *gyrA*/Position 83, *gyrA*/Position 87, *parC*/Position 80, *parC*/Position 84) konnten mittels dieses entwickelten Arrays richtig identifiziert werden. Keine Mutation wurde im Chinolon-sensitiven Isolat gefunden.

Alle resistenten Isolate außer einem haben die gleiche Mutation GyrA/S83L. Die weiteren Mutationen in Position 87 sind entweder GyrA/D87N (n=33) oder GyrA/D87Y (n=1). Das Chinolon-resistente Isolat ohne Mutation in GyrA/Position 83 hat eine GyrA/D87G Mutation. Diese Mutation wurde zwar schon für diese Position

berichtet, aber nur in der Verbindung mit einer Mutation in GyrA/Position 83 stehend²¹. Es wurde spekuliert, dass die Chinolon-Resistenz von *E. coli* durch die schrittweisen Mutationen in *gyrA* und *parC* entwickelt wurde^{39,40}. Nach den bislang bekannten Berichten fand die erste Mutation in *gyrA*/Position 83 statt. Das Vorkommen der Mutation in *gyrA*/Position 87 ohne eine Veränderung in *gyrA*/Position 83 ist in dieser Arbeit beobachtet worden. Über diese Konstellation ist selten berichtet worden⁶⁶.

Eine Analyse von *parC* zeigte, dass einige dieser 36 Isolate zusätzliche Mutationen in *parC* enthalten. Von den Chinolon-resistenten *E. coli* besitzen 28 Isolate eine Einzelmutation ParC/S80I und andere zwei Isolate eine Einzelmutation ParC/Q84K. Nur vier von 36 Isolaten haben eine Doppelmutation ParC/S80I und ParC/Q84V.

Ein resistentes Isolat hat eine Einzelmutation GyrA/D87G; Zwei resistente Isolate haben eine Dreifachmutation von GyrA/S83L, GyrA/D87N und ParC/Q84K; Ein resistentes Isolat hat eine Dreifachmutation von GyrA/S83L, GyrA/D87Y und ParC/S80I. Die anderen 27 resistenten Isolate haben eine Dreifachmutation von GyrA/S83L, GyrA/D87N und ParC/S80I; Die letzten vier resistenten Isolate haben eine Vierfachmutation von GyrA/S83L, GyrA/D87N, ParC/S80I und ParC/Q84V. Es ist bemerkenswert, dass alle 35 resistenten *E. coli* mindesten eine Mutation in *gyrA* haben. Diese Beobachtung bestätigt die Theorie⁴⁴, dass die Gyrase das Primärziel der Chinolone ist. Diese Mutation ist der Ausgangspunkt für weitere Mutationen (z.B. in *parC*), die einen erhöhten MHK-Wert für Chinolone^{8,32,44,65} verursachen.

Theoretisch können diese 35 Isolate noch zusätzliche Mutationen in *gyrA* und *parC* enthalten. Aber die Mutationen in diesen vier Positionen (*gyrA*/Position 83, *gyrA*/Position 87, *parC*/Position 80 und *parC*/Position 84) sind ausreichend, um die Chinolon-Resistenz auszulösen. In klinischen Hinsicht sollt die Behandlung von *E. coli* mit solchen Mutationen mit besonderer Vorsicht angegangen werden. In Zukunft können neue Sonden entworfen werden, sobald neue Resistenz-verursachende Mutationen aufgetaucht und charakterisiert worden sind. Durch die Integration von neuen Sonden kann das Diagnosespektrum dieses Verfahrens erweitert werden.

4.8 Fazit

Die am Anfang dieser Arbeit gestellte Zielsetzung wurde erreicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein diagnostischer Mikroarray zur Detektion von Chinolon-resistenten klinischen *E. coli* Isolaten entwickelt. Dieses Mikroarray-System besteht aus zwei Teilen: *gyrA*-Array und *parC*-Array, der jeweils die Identifikation der resistenzverursachten Mutationen in *gyrA* bzw. *parC* (häufigste Mutationsgene für Chinolon-resistentes *E. coli*) ermöglichte. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Testverfahren kann zum Screening von Chinolon-resistenten *E. coli* in der klinischen Diagnostik verwendet werden. Außerdem kann es auch für das epidemiologische Monitoring von Resistenzaufreten in Krankenhäusern sowie für die Untersuchung von Resistenzen in der Grundlagenforschung von Nutzen sein. Zusätzlich eignet sich dieses Testverfahren wegen seiner Fähigkeit, die unterschiedlichen *E. coli* Genotypen zu unterscheiden, auch für epidemiologische Studien.

Für eine Anwendung in der klinische Routinearbeit benötigt dieses Testverfahren jedoch noch weitere Entwicklungen. Vor allem ist das Detektionsvermögen in Mischproben unzureichend für eine klinische Anwendung, wo sensitive *E. coli*-Stämme durchaus im Überschuss vorliegen können. Weil sowohl die ASOH als auch die ASPE in diesem Fall kein ausreichendes Diskriminierungsvermögen lieferte, sollten andere Methode in diesem Hinsicht untersucht werden. Für eine „real time detection“ ist eine

weitere Reduzierung der Testdauer wünschenswert. Dies kann durch z.B. eine direkte Verwendung der genomischen DNS ohne PCR, die den zeitlimitierten Schritt in diesem Assay ist, erreicht werden. Um dennoch eine ausreichende Sensitivität zu erreichen, könnte ein Signalamplifikationsschritt (z.B. bDNA: *branched* DNA) eingebaut werden. Eine Erweiterung des Arrays zur Detektion von Mutationen, die eine reduzierte intrazelluläre Chinolon-Akkumulation verursachen, wäre ebenfalls von großer klinischer Interesse.

Literaturverzeichnis

1. Affymetrix USAm Inc. WO9743450. 1997. [Personal Communication]
2. Ahmadian,A., Gharizadeh,B., O'Meara,D., Odeberg,J., & Lundeberg,J. Genotyping by apyrase-mediated allele-specific extension. *Nucleic Acids Research* **29**, e121 (2001).
3. Ahrendt,S.A., Halachmi,S., Chow,J.T., Wu,L., Halachmi,N., Yang,S.C., Wehage,S., Jen,J., & Sidransky,D. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 7382-7387 (1999).
4. Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., & Lipman,D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410 (1990).
5. Anthony,R.M., Brown,T.J., & French,G.L. DNA array technology and diagnostic microbiology. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* (2001).
6. Ba,B.B., Feghali,H., Arpin,C., Saux,M.C., & Quentin,C. Activities of ciprofloxacin and moxifloxacin against *Stenotrophomonas maltophilia* and emergence of resistant mutants in an in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**, 946-53 (2004).
7. Bachoual,R., Tankovic,J., & Soussy,C.J. Analysis of the mutations involved in fluoroquinolone resistance of in vivo and in vitro mutants of *Escherichia coli*. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* **4**, 271-276 (1998).
8. Bagel,S., Hullen,V., Wiedemann,B., & Heisig,P. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 868-875 (1999).
9. Barclay,M.L. & Begg,E.J. Aminoglycoside adaptive resistance: importance for effective dosage regimens. *Drugs.* **61**, 713-721 (2001).
10. Bassett,D.E., Eisen,M.B., & Boguski,M.S. Gene expression informatics - it's all in your mine. *Nature Genetics* **21**, 51-55 (1999).
11. Behr,T., Koob,C., Schedl,M., Mehlen,A., Meier,H., Knopp,D., Frahm,E., Obst,U., Schleifer,K., Niessner,R., & Ludwig,W. A nested array of rRNA targeted probes for the detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst Appl Microbiol.* 563-72 (2000).

12. Bergstrom,D.E., Zhang,P., & Johnson,W.T. Comparison of the base pairing properties of a series of nitroazole nucleobase analogs in the oligodeoxyribonucleotide sequence 5'-d(CGCXAATTYGCG)-3'. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1935-42 (1997).
13. Blanchard,A. Synthetic DNA arrays. *Genetic Engineering, Principles and Methods* (1998).
14. Booth,S., Drobot,M., Martin,I., & Ng,LK. Design of oligonucleotide arrays to detect point mutations: molecular typing of antibiotic resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* and hantavirus infected deer mice. *Mol Cell Probes* **17**, 77-84 (2003).
15. Brandt,O., Feldner,J., Stephan,A., Schroder,M., Schnolzer,M., Arlinghaus,H.F., Hoheisel,J.D., & Jacob,A. PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Res.* **31**, e119 (2003).
16. Brown T.J. & Anthony,R.M. The addition of low numbers of 3' thymine bases can be used to improve the hybridization signal of oligonucleotides for use within arrays on nylon supports. *J Microbiol Methods.* **42**, 203-207 (2000).
17. Bundesamt für Gesundheit, Bundesamt für Veterinärwesen, Bundesamt für Landwirtschaft, Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Forschungsanstalt für Nutztiere, Schweizerischer Bauernverband, Istituto Cantonale Bacteriosierologico, Universität Bern, Universität Zürich, and ETH Zürich. Kurzfassung der Situationsanalyse "Bakterielle Antibiotikaresistenz in den Bereichen Humanmedizin, Veterinärmedizin und Lebensmittel". 2003. [Report]
18. Chen,J.Y., Siu,L.K., Chen,Y.H., Lu,P.L., Ho,M., & Peng,C.F. Molecular epidemiology and mutations at *gyrA* and *parC* genes of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates from a Taiwan medical center. *Microb. Drug Resist.* **7**, 47-53 (2001).
19. Chisholm,S.A. & Owen,R.J. Development and application of a novel screening PCR assay for direct detection of '*Helicobacter heilmannii*'-like organisms in human gastric biopsies in Southeast England. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **46**, 1-7 (2003).
20. Cole,K.A., Krizman,D.B., & Emmert-Buck,M.R. The genetics of cancer - a 3D model. *Nature Genetics* **21**, 38-41 (1999).
21. Conrad,S., Oethinger,M., Kaifel,K., Klotz,G., Marre,R., & Kern,W.V. *gyrA* mutations in high-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**, 443-455 (1996).
22. Cronin,M.T., Fucini,R.V., Kim,S.M., Masino,R.S., Wespi,R.M., & Miyada,C.G. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Human Mutation* **7**, 244-255 (1996).
23. Crumplin,G.C. Mechanisms of resistance to the 4-quinolone antibacterial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **26 Suppl F**, 131-144 (1990).

24. Cullen, M.E., Wyke, A.W., Kuroda, R., & Fisher, L.M. Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 886-894 (1989).
25. DeRisi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M.L., Meltzer, P.S., Ray, M., Chen, Y.D., Su, Y.A., & Trent, J.M. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics* **14**, 457-460 (1996).
26. DeRisi, J., Penland, L., Brown, P.O., Bittner, M.L., Meltzer, P.S., Ray, M., Chen, Y.D., Su, Y.A., & Trent, J.M. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics* **14**, 457-460 (1996).
27. Drmanac, S., Kita, D., Labat, I., Hauser, B., Schmidt, C., Burczak, J.D., & Drmanac, R. Accurate sequencing by hybridization for DNA diagnostics and individual genomics. *Nature Biotechnology* **16**, 54-58 (1998).
28. Dubiley, S., Kirillov, E., & Mirzabekov, A. Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers. *Nucleic Acids Research* (1999).
29. Edman, C.F., Raymond, D.E., Wu, D.J., Tu, E., Sosnowski, R.G., Butler, W.F., Nerenberg, M., & Heller, M.J. Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4907-4914 (1997).
30. Erdogan, F., Kirchner, R., Mann, W., Ropers, H.H., & Nuber, U.A. Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Research* (2001).
31. Evans, J.G. & Lee-Tataseo, C. Determination of the factor V Leiden single-nucleotide polymorphism in a commercial clinical laboratory by use of nanochip microelectronic array technology. *Clinical Chemistry* **48**, 1406-1411 (2002).
32. Everett, M.J., Jin, Y.F., Ricci, V., & Piddock, L.J.V. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2380-2386 (1996).
33. Fisher, L.M., Lawrence, J.M., Josty, I.C., Hopewell, R., Margerrison, E.E., & Cullen, M.E. Ciprofloxacin and the fluoroquinolones. New concepts on the mechanism of action and resistance. *Am. J. Med.* **87**, 2S-8S (1989).
34. Fotin, A.V., Drobyshch, A.L., Proudnikov, D.Y., Perov, A.N., & Mirzabekov, A.D. Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Research* **26**, 1515-1521 (1998).
35. Goss, W.A., Deitz, W.H., & Cook, T.M. MECHANISM OF ACTION OF NALIDIXIC ACID ON *ESCHERICHIA COLI*. *J Bacteriol.* **88**, 1112-1118 (1964).

36. Gunderson, K.L., Huang, X.H.C., Morris, M.S., Lipshutz, R.J., Lockhart, D.J., & Chee, M.S. Mutation detection by ligation to complete n-mer DNA arrays. *Genome Research* **8**, 1142-1153 (1998).
37. Hacia, J.G., Brody, L.C., Chee, M.S., Fodor, S.P.A., & Collins, F.S. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nature Genetics* **14**, 441-447 (1996).
38. Hansen, H. & Heisig, P. Topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant salmonellae selected in vitro. *Microb Drug Resist.* **9**, 25-32 (2003).
39. Heisig, P. Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 879-885 (1996).
40. Heisig, P. & Tschorny, R. Characterization of Fluoro Quinolone-Resistant Mutants of Escherichia-Coli Selected In-Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 1284-1291 (1994).
41. Hooper, D.C., Wolfson, J.S., Ng, E.Y., & Swartz, M.N. Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. *Am. J. Med.* **82**, 12-20 (1987).
42. Huang, M.M., Arnheim, N., & Goodman, M.F. Extension of Base Mispairs by Taq Dna-Polymerase - Implications for Single Nucleotide Discrimination in Pcr. *Nucleic Acids Research* **20**, 4567-4573 (1992).
43. Intercontinental Medical Statistics. 1995. Ruislip, UK. [Report]
44. Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L., & Cozzarelli, N.R. Topoisomerase IV is a target of quinolones in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 11801-11805 (1995).
45. Kresken, M. and Hafner, D. Prävalenz der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Infektionserregern in Mitteleuropa: Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft "Resistenz" in der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahr 1995. 1996. [Report]
46. Kurg, A., Tonisson, N., Georgiou, I., Shumaker, J., Tollett, J., & Metspalu, A. Arrayed primer extension: Solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology. *Genetic Testing* **4**, 1-7 (2000).
47. Kwok, P.Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **2**, 235-258 (2001).
48. Le Crom, S., Devaux, F., Jacq, C., & Marc, P. yMGV: helping biologists with yeast microarray data mining. *Nucleic Acids Research* **30**, 76-79 (2002).
49. Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., & Bundage, R.P. NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. *J Med Pharm Chem.* 1063-5 (1962).

50. Linde,H.J. & Lehn,N. Mutant prevention concentration of nalidixic acid, ciprofloxacin, clinafloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin or trovafloxacin for Escherichia coli under different growth conditions. *J Antimicrob Chemother.* **53**, 252-257 (2004).
51. Liu,H. & Nichols,R. Pcr Amplification Using Deoxyinosine to Replace An Entire Codon and at Ambiguous Positions. *Biotechniques* **16**, 24-26 (1994).
52. Loakes,D. & Brown,D.M. 5-Nitroindole as an universal base analogue. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4039-43 (1994).
53. Lockhart,D.J., Dong,H., Byrne,M.C., Follettie,M.T., Gallo,M.V., Chee,M.S., Mittmann,M., Wang,C., Kobayashi,M., Horton,H., & Brown,E.L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* **14**, 1675-1680 (1996).
54. Ludwig,W., Amann,M., Martinez-Romero,E., Schönhuber,W., Bauer,S., Neef,A., & Schleifer,K.-H. rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. *Plant and Soil* **204**, 1-19 (1998).
55. Martin,F.H., Castro,M.M., Aboulela,F., & Tinoco,I. Base-Pairing Involving Deoxyinosine - Implications for Probe Design. *Nucleic Acids Research* **13**, 8927-8938 (1985).
56. Meinkoth,J. & Wahl,G.M. Enzyme zum Modifizieren und Markieren von DNA und RNA. *Methods Enzymol* **152**, 91-94 (1987).
57. Milner,N., Mir,K.U., & Southern,E.M. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* **15**, 537-541 (1997).
58. Mir,K.U. & Southern,E.M. Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* **17**, 788-792 (1999).
59. Molecular Dynamics Application Note 62: Fluorescent DNA Labelling by PCR. *Molecular Dynamics and Amersham Pharmacia Biotech.* http://www.mdyn.com/app_notes/appnotes/AN62.pdf (1999).
60. Naber KG und, Adam D, & die Expertengruppeder Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie.V. Einteilung der Fluorchinolone. *Chemother J* 66-68 (1998).
61. Ng,L.K., Sawatzky,P., Martin,I.E., & Booth,S. Characterization of ciprofloxacin resistance in Neisseria gonorrhoeae isolates in Canada. *Sexually Transmitted Diseases* **29**, 780-788 (2002).
62. Nguyen,H.K., Southern,E.M., & Southern EM. Minimising the secondary structure of DNA targets by incorporation of a modified deoxynucleoside: implications for nucleic acid analysis by hybridisation. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3904-3909 (2000).

63. Nikiforov, T.T., Rendle, R.B., Goelet, P., Rogers, Y.H., Kotewicz, M.L., Anderson, S., Trainor, G.L., & Knapp, M.R. Genetic Bit Analysis - A Solid-Phase Method for Typing Single Nucleotide Polymorphisms. *Nucleic Acids Research* **22**, 4167-4175 (1994).
64. O'Meara, D., Ahmadian, A., Odeberg, J., & Lundeberg, J. SNP typing by apyrase-mediated allele-specific primer extension on DNA microarrays. *Nucleic Acids Research* **30**, (2002).
65. Oethinger, M., Kern, W.V., Jellen-Ritter, A.S., McMurry, L.M., & Levy, S.B. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 10-13 (2000).
66. Ouabdesselam, S., Hooper, D.C., Tankovic, J., & Soussy, C.J. Detection of GyrA and GyrB Mutations in Quinolone-Resistant Clinical Isolates of *Escherichia-Coli* by Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis and Determination of Levels of Resistance Conferred by 2 Different Single GyrA Mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 1667-1670 (1995).
67. Pastinen, T., Kurg, A., Metspalu, A., Peltonen, L., & Syvanen, A.C. Minisequencing: A specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Research* **7**, 606-614 (1997).
68. Pastinen, T., Raitio, M., Lindroos, K., Tainola, P., Peltonen, L., & Syvanen, A.C. A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Research* **10**, 1031-1042 (2000).
69. Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P., & Fodor, S.P.A. Light-Generated Oligonucleotide Arrays for Rapid Dna-Sequence Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5022-5026 (1994).
70. Perez-Trallero, E., Marimon, J.M., Iglesias, L., & Larruskain, J. Fluoroquinolone and macrolide treatment failure in pneumococcal pneumonia and selection of multidrug-resistant isolates. *Emerg Infect Dis.* **9**, 1159-1162 (2003).
71. Power, E.G., Munoz Bellido, J.L., & Phillips, I. Detection of ciprofloxacin resistance in gram-negative bacteria due to alterations in gyrA. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**, 9-17 (1992).
72. Qiang, Y.Z., Qin, T., Fu, W., Cheng, W.P., Li, Y.S., & Yi, G. Use of a rapid mismatch PCR method to detect gyrA and parC mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 549-552 (2002).
73. Santacroce, R., Ratti, A., Caroli, F., Foglieni, B., Ferraris, A., Cremonesi, L., Margaglione, M., Seri, M., Ravazzolo, R., Restagno, G., Dallapiccola, B., Rappaport, E., Pollak, E.S., Surrey, S., Ferrari, M., & Fortina, P. Analysis of clinically relevant single-nucleotide polymorphisms by use of microelectronic array technology. *Clinical Chemistry* **48**, 2124-2130 (2002).

74. SantaLucia, J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 1460-1465 (1998).
75. Schedl, M., Behr, T., Ludwig, W., Schieffer, K.H., Niessner, R., & Knopp, D. Optimization of reverse hybridization in microplates coated with rRNA targeted oligonucleotide probes. *Syst Appl Microbiol.* **23**, 573-81 (2000).
76. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., & Brown, P.O. Quantitative Monitoring of Gene-Expression Patterns with A Complementary-Dna Microarray. *Science* **270**, 467-470 (1995).
77. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., & Brown, P.O. Quantitative Monitoring of Gene-Expression Patterns with A Complementary-Dna Microarray. *Science* **270**, 467-470 (1995).
78. Shchepinov, M.S., Mir, K.U., Elder, J.K., Frank-Kamenetskii, M.D., & Southern, E.M. Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3035-3041 (1999).
79. Shimizu, M. Progress and future prospect of pyridonecarboxylic acids. *Kansenshogaku Zasshi* **62 Suppl**, 192-201 (1988).
80. Smith, J.T. The mode of action of 4-quinolones and possible mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **18 Suppl D**, 21-29 (1986).
81. Sosnowski, R.G., Tu, E., Butler, W.F., O'Connell, J.P., & Heller, M.J. Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 1119-23 (1997).
82. Southern, E., Mir, K., & Shchepinov, M. Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics* **21**, 5-9 (1999).
83. Southern, E.M., Casegreen, S.C., Elder, J.K., Johnson, M., Mir, K.U., Wang, L., & Williams, J.C. Arrays of Complementary Oligonucleotides for Analyzing the Hybridization Behavior of Nucleic-Acids. *Nucleic Acids Research* **22**, 1368-1373 (1994).
84. Sun, L., Sreedharan, S., Plummer, K., & Fisher, L.M. NorA plasmid resistance to fluoroquinolones: Role of copy number and norA frameshift mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 1665-1669 (1996).
85. T Hoen, P.A.C., de Kort, F., van Ommen, G.J.B., & den Dunnen, J.T. Fluorescent labelling of cRNA for microarray applications. *Nucleic Acids Research* **31**, (2003).
86. Tecan. Applikation Note: HS 4800 Microarray hybridization - A comparison of manual and automated methods with a focus on homogeneity and reproducibility. <http://www.tecan.com/com-pdf-hs4800-applicationnote-microarrayhybridization-11.pdf>.

87. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882 (1997).
88. Tillib, S.V. & Mirzabekov, A. Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 53-58 (2001).
89. Tolstrup, N., Nielsen, P.S., Kolberg, J.G., Frankel, A.M., Vissing, H., & Kauppinen, S. OligoDesign: optimal design of LNA (locked nucleic acid) oligonucleotide capture probes for gene expression profiling. *Nucleic Acids Research* **31**, 3758-3762 (2003).
90. Tonisson, N., Kurg, A., Kaasik, K., Lohmussaar, E., & Metspalu, A. Unravelling genetic data by arrayed primer extension. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **38**, 165-170 (2000).
91. Troesch, A., Nguyen, H., Miyada, C.G., Desvarenne, S., Gingeras, T.R., Kaplan, P.M., Cros, P., & Mabilat, C. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* **37**, 49-55 (1999).
92. Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., & Deanta, M.T.J. Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 491-493 (1996).
93. Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M.S., Shen, N.P., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T.J., Lipshutz, R., Chee, M., & Lander, E.S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* **280**, 1077-1082 (1998).
94. Wang, M., Sahm, D.F., Jacoby, G.A., & Hooper, D.C. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in Klebsiella pneumoniae clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**, 1295-1299 (2004).
95. Wang, Y., Vaidya, B., Farquar, H.D., Stryjewski, W., Hammer, R.P., McCarley, R.L., Soper, S.A., Cheng, Y.W., & Barany, F. Microarrays assembled in microfluidic chips fabricated from poly(methyl methacrylate) for the detection of low-abundant DNA mutations. *Anal Chem.* **75**, 1130-1140 (2003).
96. Weiler, J., Gausepohl, H., Hauser, N., Jensen, O.N., & Hoheisel, J.D. Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. *Nucleic Acids Research* **25**, 2792-2799 (1997).
97. Welford, S.M., Gregg, J., Chen, E., Garrison, D., Sorensen, P.H., Denny, C.T., & Nelson, S.F. Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues

- using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Research* **26**, 3059-3065 (1998).
98. Whitcombe,D., Newton,C.R., & Little,S. Advances in approaches to DNA-based diagnostics. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 602-608 (1998).
 99. Yershov,G., Barsky,V., Belgovskiy,A., Kirillov,E., Kreindlin,E., Ivanov,I., Parinov,S., Guschin,D., Drobishev,A., Dubiley,S., & Mirzabekov,A. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 4913-4918 (1996).
 100. Yoneyama,H., Ocaktan,A., Tsuda,M., & Nakae,T. The role of mex-gene products in antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **233**, 611-618 (1997).
 101. Yoo,J.H., Huh,D.H., Choi,J.H., Shin,W.S., Kang,M.W., Kim,C.C., & Kim,D.J. Molecular epidemiological analysis of quinolone-resistant *Escherichia coli* causing bacteremia in neutropenic patients with leukemia in Korea. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 1385-1391 (1997).
 102. Yoshida,H., Bogaki,M., Nakamura,M., Yamanaka,L.M., & Nakamura,S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1647-1650 (1991).
 103. Yu, X. L., Susa, M, Knabbe, C., Schmid, R. D., and Bachmann, T. T. Development and validation of a diagnostic DNA-microarray to detect quinolone-resistant *Escherichia coli* in clinical isolates. *J Clin Microbiol* . 42 (9), 2004.
 104. Zhang C & Rikihisa,Y. Evaluation of sensitivity and specificity of a *Mycoplasma haemomuris*-specific polymerase chain reaction test. *Comp Med.* 2002 Aug **52**, 313-315 (2002).
 105. Zhou,Y.H. & Liu,J.D. AVA: visual analysis of gene expression microarray data. *Bioinformatics* **19**, 293-294 (2003).

Anhang

Abkürzungen

APEX	<i>arrayed primer extension</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ASOH	<i>allele-specific oligonucleotide probe hybridisation</i>
ASOL	<i>allele-specific oligonucleotide ligation</i>
ASPE	<i>allele-specific primer extension</i>
ASSE	<i>allele-specific single base extension</i>
bDNA	<i>branched DNA</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basepaare
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CFU	Kolonie bildende Einheit
CGI	<i>Common Gateway Interface</i>
Cipro	Ciprofloxacin
Cy	Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
dsDNS	doublestrange DNS
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde
HTML	<i>hypertext markup language</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
kb	Kilobase
Levo	<i>Levofloxacin</i>
MAMA	mismatch amplification mutation assay
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MM	<i>mismatch</i>
RFLP	restriction fragment length polymorphism
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Perl	<i>Practical extraction and report language</i>
PLL	poly-L-lysine
PM	<i>perfect match</i>
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
PTO	Phosphothioate
QRDR	<i>quinolone resistance determining region</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulphate</i> (Natriumdodecylsulphat)

SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SQL	<i>structured query language</i>
SSC	<i>Sodium Chloride Sodium Citrate e</i> (Natriumchlorid-Natriumcitrat)
SSCP	<i>single-strand conformational polymorphism</i>
ssDNS	einzelstrang DNS
SSPE	<i>Sodium Chloride Sodium Phosphate</i> EDTA
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Buffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Buffer
TE	Tris-EDTA-Buffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tm:	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
UV	Ultraviolett

Sequenzen der QRDR der klinischen Isolate

Auf den folgenden Seiten sind die in vorliegender Arbeit ermittelten *gyrA*- und *parC*-Sequenzen innerhalb der QRDR von klinischen *E. coli* Isolaten in FASTA-Format abgedruckt.

Sequenzen von *gyrA*

>*E. coli* 1

```
GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTCGGCGGTTTATGA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG
```

>*E. coli* 2

```
GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG
```

>*E. coli* 3

```
GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG
```

>*E. coli* 4

```
GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG
```

>*E. coli* 5

```
GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG
```

>*E. coli* 6

```
GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG
```

>*E. coli* 7

```
GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTCTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAG
```

>*E. coli* 8

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTCTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 9

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 10

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 11

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 12

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 13

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 14

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 15

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 16

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 17

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 18

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 19

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 20

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 21

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 22

GCCCGTGTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGTATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 23

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTCTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTATATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 24

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 25

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 26

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATTA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 27

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 28

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTCGGCGGTTTATGG
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 29

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 30

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 31

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 32

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 33

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 34

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 35

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

>*E. coli* 36

GCCCGTGTTCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACCATCCCCATGGTGACTTGGCGGTTTATAA
CACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTCGCTGCGTTACATGCTGGTAGACGGTCAG

Sequenzen von *parC*>*E. coli* 1GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATAGCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 2GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 3GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 4GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 5GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 6GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 7GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 8GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 9GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 10GCTCGTACTGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCATGGCGACATCGCCTGCTATGA
AGCGATGGTGCTGATGGCGCAGCCATTCTCTTATCGTTATCCGCTGGTGGACGGGCAG>*E. coli* 11GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATTGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 12GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 13GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG>*E. coli* 14GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 15

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATTGCCTGTTATGT
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 16

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATTGCCTGTTATGT
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 17

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATTGCCTGTTATGT
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 18

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATTGCCTGTTATGT
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 19

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 20

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 21

GCTCGTACTGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCATGGCGACATCGCCTGCTATGA
AGCGATGGTGCTGATGGCGCAGCCATTCTCTTATCGTTATCCGCTGGTGGACGGGCAG

>*E. coli* 22

GCTCGTACTGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCATGGCGACATCGCCTGCTATGA
AGCGATGGTGCTGATGGCGCAGCCATTCTCTTATCGTTATCCGCTGGTGGACGGGCAG

>*E. coli* 23

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 24

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 25

GCTCGTACTGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCATGGCGACATCGCCTGCTATGA
AGCGATGGTGCTGATGGCGCAGCCATTCTCTTATCGTTATCCGCTGGTGGACGGGCAG

>*E. coli* 26

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATAGCGCCTGTTATAA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 27

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 28

GCTCGTACTGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCATGGCGACATCGCCTGCTATGA
AGCGATGGTGCTGATGGCGCAGCCATTCTCTTATCGTTATCCGCTGGTGGACGGGCAG

>*E. coli* 29

GCCCGTACCGTCGGTGACGTA CTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAACCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 30

GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATAGTGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 31

GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATTGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 32

GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATTGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 33

GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATCGCCTGTTATGA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 34

GCTCGTACTGTTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCATGGCGACATCGCCTGCTATGA
AGCGATGGTGCTGATGGCGCAGCCATTCTCTTATCGTTATCCGCTGGTGGACGGGCAG

>*E. coli* 35

GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATAGCGCCTGTTATAA
AGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

>*E. coli* 36

GCCCGTACCGTCGGTGACGTACTGGGTAAATACCATCCGCACGGCGATATTGCCTGTTA
TGAAGCGATGGTCCTGATGGCGCAGCCGTTCTCTTACCGTTATCCGCTGGTTGATGGTCAG

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Rolf D. Schmid für die interessante Themenstellung, die Möglichkeit, selbstständig unter hervorragenden Bedingungen zu arbeiten, sowie die motivierende Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinem Betreuer Herrn Dr. T. T. Bachmann, dem Arbeitsgruppenleiter der Gruppe Analytische Biotchnologie, danke ich für die fachliche Einführung und wissenschaftlichen Diskussionen sowie seine Hilfe beim Verfassen der Publikationen und dieser Dissertation.

Frau Verena Grimm bedanke ich mich für ihre Geduld beim Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit, sowie die fachlichen Ratschläge und Diskussion im Verlauf dieser Arbeit. Ganz besonders bedanke ich für die freundliche Zusammenarbeit in dem GenoMik Projekt.

Frau Jutta Secker danke ich für die Sequenzierung der zahlreichen klinischen Isolate.

Frau Beate Rössle-Lorch möchte ich für ihre technische Unterstützung im GenoMik Projekt danken.

Bei den Mitarbeitern der Forschungsgruppe am Zentrum für Diagnostische Medizin des Robert-Bosch-Krankenhauses unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Cornelius Knabbe bedanke ich mich für die Sammlung der zahlreichen klinischen Isolate und die Isolation ihrer genomischen DNS.

Herrn Dr. Satoshi Ezaki bedanke ich mich für die Einleitung in die Mikroarray-Welt sowie seine fachliche Unterstützung zur Beginn meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Witte möchte ich für die überaus nützliche Fachinformation bedanken.

Herrn PD Dr. Wolfgang Ludwig und Herrn Dr. Ralf Petri bedanke ich mich für die ausführliche Einführung in der Software ARB.

Den Firmen Eppendorf AG und Eppendorf Array Technologies danke ich für die fachliche Unterstützung sowie die Bereitstellung von Materialien für die Mikroarray-Experimente.

Herrn Markus Fischer möchte ich für die Einleitung in die bioinformatische Arbeit danken.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich mich für die Finanzierung meiner Arbeit. Diese Arbeit entstand im Rahmen eines vom

Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojekts (GenoMik Projekt: Genome Research on Microorganisms) am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann, die mir in allen Lebenslagen zur Seite standen.

Einer ganzen Reihe von gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Analytische Biotchnologie, des GenoMik-Projekts sowie des Instituts für Technische Biochemie möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Lebenslauf

Persönliche Angaben: Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: Chinesisch
Geburtsdatum: 06. Mai 1971
Geburtsort: Shanghai, VR. China

Ausbildung in China

Sep. 1978 – Aug. 1983 Grundschule in Shanghai, VR. China
Sep. 1983 – Aug. 1986 Mitteschule namens Jinyuan in Shanghai, VR. China
Sep. 1986 – Aug. 1989 Gymnasium zur Fudan Universität in Shanghai, VR. China
Sep. 1989 – Aug. 1993 Technische Universität Shanghai, Fachrichtung Biochemie, in Shanghai, VR. China

Abschluss: Bachelor of Engineering.

Beruf in China

Sep. 1993 – Feb. 1997 Shanghai Huaxin Biotechnologie GmbH, Forschungsabteilung.
Die Arbeit bestand in wesentlichen aus der Entwicklung der neuartigen therapeutischen Proteinen mit der rekombinanten DNS Technologie und der Proteinbiotechnologie.

Studium in Deutschland

März 1997 – Sep. 1997 Deutschkurse an der Universität Stuttgart.
Okt. 1997 – Sep. 2001 Studium der technischen Biologie, Universität Stuttgart

Hauptfach: Technische Biochemie

Nebenfächer: Hefegenetik und Bioinformatik

Diplomarbeit: „Aufbau einer Online-Enzym-Datenbank zum Untersuchen der Beziehung zwischen Sequenzen, Strukturen und Funktionen“

Institute für Technische Biochemie der Universität Stuttgart, Prof. Dr. Rolf D. Schmid

Abschluss: Diplom Biologin (technische orientiert).

Gesamturteil: „Auszeichnung“

Okt. 2001 – Sep. 2004 **Promotion:** „Entwicklung eines diagnostischen DNS-Mikroarrays zur Genotypisierung der Chinolon-Resistenz von *Escherichia coli*“

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart, Prof. Dr. Rolf D. Schmid