

DNA-Microarrays zur Identifizierung von
pathoadaptiven Mutationen und Antibiotikaresistenzen
in extraintestinal pathogenen *Escherichia coli* (ExPEC)

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

vorgelegt von Timo Barl
aus Speyer

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2007

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Mitberichter: PD Dr. Till T. Bachmann

Institut für Technische Biochemie
Universität Stuttgart

2007

*Für Elina...
...weil du einmalig bist*

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Edinburgh, im September 2007

Timo Barl

Inhalt

Zusammenfassung	1
Summary	2
Background	2
Detection of pathoadaptive mutations with a DNA microarray	3
Integration of a microarray for the detection of quinolone resistance	6
Employment of a mismatch specific endonuclease	9
Conclusion and outlook	10
1. Einleitung	11
1.1. <i>Escherichia coli</i> - auch ein pathogener Organismus	11
1.2. Virulenzfaktoren in ExPEC	13
1.3. Typ 1-Fimbrien	15
1.4. Pathoadaptive Mutationen	17
1.5. Relevante Resistenzen in <i>Escherichia coli</i>	18
1.6. Methoden zur Detektion pathogener Stämme	20
1.7. Methoden zur Genotypisierung	23
1.8. Zielstellung dieser Arbeit	25
2. Material und Methoden	27
2.1. Materialien	27
2.1.1. Geräte	27
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien	27
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	28
2.1.4. Zusammensetzung der Puffer und Lösungen	28
2.1.5. Software	29
2.1.6. Stämme und Isolate	29
2.2. Sequenzanalyse und Sondendesign	33
2.3. Amplifizierung der Ziel-DNA	34
2.4. Sequenzierung	34
2.5. Prozessierung der Ziel-DNA	36
2.6. Genotypisierung mit allelspezifischen Sonden	36
2.6.1. Spotting	36
2.6.2. Hybridisierung und Erfassung der Fluoreszenzsignale	36
2.6.3. Quantifizierung der Fluoreszenzsignale	38
2.7. Versuche mit der mismatchspezifischen Surveyor Nuclease	40
2.7.1. Spaltung von Heteroduplexen in Lösung	40
2.7.2. Einsatz der Nuklease auf einem DNA-Microarray	41
3. Ergebnisse	43
3.1. Etablierung eines Assays zur Detektion von <i>fimH</i> -Mutationen	43
3.1.1. Sequenzanalyse und Sondendesign	43
3.1.2. Etablierung der Amplifizierung von <i>fimH</i>	46
3.1.3. Optimierung der Parameter für die Hybridisierung	48
3.1.4. Hybridisierungsexperimente mit weiteren Referenzstämmen	51
3.1.5. Sensitivität des Assays	53
3.1.6. Reduktion der Assayzeit	54

3.2.	Untersuchung von <i>fimH</i> -Varianten	58
3.2.1.	Klinische Isolate	58
3.2.2.	Einfluss der Einbaurate auf die Hybridisierung	61
3.2.3.	Robustheit der Diskriminierung zwischen allelspezifischen Sonden ...	63
3.2.4.	Einfluss von stillen Mutationen auf die Hybridisierung	65
3.2.5.	Untersuchung der Spotmorphologie	67
3.2.6.	Mischpopulationen	69
3.2.7.	Untersuchung der ECOR-Sammlung	71
3.2.8.	<i>fimH</i> -Sequenzalignment	74
3.2.9.	Sequenzanalyse der <i>fimH</i> -Varianten	76
3.2.10.	Fazit	78
3.3.	Validierung des <i>gyrA</i> -Microarrays	79
3.3.1.	Analyse von <i>gyrA</i> -Sequenzen und Sondendesign	79
3.3.2.	Amplifizierung von <i>gyrA</i>	80
3.3.3.	Validierung der <i>gyrA</i> -Sonden mit den Referenzstämmen	81
3.4.	Integration des <i>gyrA</i> -Microarrays	84
3.4.1.	Simultane Amplifizierung von <i>gyrA</i> und <i>fimH</i>	84
3.4.2.	Untersuchung der Kreuzhybridisierungen	84
3.4.3.	Validierung des integrierten Microarrays	86
3.4.4.	Untersuchung von verblindeten Proben	87
3.4.5.	Untersuchung der ECOR-Isolate	89
3.4.6.	Untersuchung von resistenten klinischen Isolaten	89
3.4.7.	Untersuchung des Laborstammes <i>E. coli</i> DH5 α	91
3.4.8.	Fazit	92
3.5.	Einsatz der Surveyor Nuclease zur verbesserten Genotypisierung	93
3.5.1.	Enzymaktivität in Lösung	93
3.5.2.	Aktivität des Enzyms auf einem Microarray	93
3.5.3.	Fazit	96
4.	Diskussion	97
4.1.	Klinische Relevanz der verwendeten Sonden	97
4.2.	Phylogenetische Relevanz der untersuchten Positionen	100
4.2.1.	Überblick über identifizierte <i>fimH</i> -Mutationen	100
4.2.2.	Spezifität einzelner <i>fimH</i> -Sonden	100
4.2.3.	Spezifität von <i>gyrA</i> -Mutationen	102
4.2.4.	Bestimmung der phylogenetischen Zugehörigkeit	103
4.2.5.	<i>fimH</i> :IS 1-Element	105
4.3.	Leistungsmerkmale des Microarrays	106
4.3.1.	Reduktion der Assayzeit	106
4.3.2.	Der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Signalintensität	107
4.3.3.	Diskriminierung zwischen allelischen Varianten	109
4.4.	Verbesserte Prozessierung der Daten	111
4.5.	Verbesserte Genotypisierung durch den Einsatz einer Nuklease	112
4.6.	Ausblick	114
5.	Anhang	117
5.1.	Literaturverzeichnis	117
5.2.	Abkürzungsverzeichnis	134
5.3.	<i>fimH</i> -Sequenzen	135

6. Veröffentlichungen aus dieser Arbeit.....	147
6.1. Publikationen.....	147
6.2. Patentantrag.....	147
6.3. Konferenzbeiträge	147
Danksagung	I
Lebenslauf.....	II

Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung von DNA-Microarrays zur Genotypisierung von *E. coli* für die klinische Diagnostik. Im ersten Teil der Dissertation wurde ein DNA-Microarray zur Detektion der häufigsten pathoadaptiven Mutationen in der Bindeuntereinheit von Typ 1-Fimbrien (FimH), die das Pathogenitätspotential von extraintestinal pathogenen *Escherichia coli*-Stämmen (ExPEC) erhöhen, entwickelt. Dieser Microarray wurde verwendet, um die *fimH*-Varianten von 131 *E. coli*-Isolaten zu genotypisieren. Sämtliche Ergebnisse wurden durch Sequenzierung bestätigt. Die insgesamt 16 nachgewiesenen verschiedenen Mutationen traten grundsätzlich in Kombination mit der dominanten Mutation V27A auf. Zusätzlich konnten für die hauptsächlich kommensalischen Gruppe A-Stämme die Mutation A202V bzw. für die pathogenen Gruppe B2-Stämme N70S, S78N und R166H als spezifische Marker identifiziert werden.

In einem zweiten Teil wurde der vorbeschriebene *gyrA*-Microarray (Yu et al. 2004) zur Detektion der Fluorchinolonresistenz in *E. coli* überarbeitet und anschließend mit dem *fimH*-Microarray in einen Array integriert. Dabei wurden Mutationen an den Aminosäure-Positionen 83 und 87 berücksichtigt, die den ersten Schritt einer stufenweisen Akkumulation von Mechanismen darstellen, die zu einer klinisch relevanten Resistenz führen. Mit dem integrierten Array zur simultanen Detektion der relevanten Mutationen in *fimH* und *gyrA* wurden 141 Isolate genotypisiert. Dabei wurde in insgesamt 30 Isolaten mindestens eine resistenzauslösende Mutation nachgewiesen. Bei allen betroffenen Isolaten handelte es sich dabei ausnahmslos um Isolate aus Harnwegsinfektionen. Unter anderem konnte die phänotypische Chinolonresistenz von sechs klinischen Isolaten jeweils auf eine *gyrA*-Doppelmutation zurückgeführt werden. Zusätzlich wurde *gyrA* 255C als eine weitere Gruppe A-spezifische Position identifiziert.

Die in dieser Arbeit verwendete Technologie der allelspezifischen Hybridisierung erwies sich als äußerst robust und leistungsfähig. Allerdings ist ein grundsätzliches Merkmal der Methode, dass für die unterschiedlichen SONDENSätze häufig verschiedene Diskriminierungen zwischen Perfect Match- und Mismatchsonden beobachtet werden. Im dritten Teil dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass der Einsatz einer mismatchspezifischen Endonuklease (Surveyor Nuclease) zu einer verbesserten Auflösung insbesondere für cytosinhaltige Fehlpaarungen bei einem Oligonukleotidarray führt.

Abschließend betrachtet wurden in dieser Arbeit eine Reihe grundlegender Ergebnisse über die allelspezifische Hybridisierung gewonnen: (1) Stille Mutationen in der Ziel-DNA sowie die Einbaurrate des Fluoreszenzfarbstoffs hatten einen signifikanten Einfluss auf die absolute Signalintensität, waren jedoch für die Diskriminierung der Varianten unerheblich. (2) Mit einem 22 min dauernden PCR-Programm konnte ausreichend Ziel-DNA amplifiziert werden, um eine eindeutige Genotypisierung durchzuführen. Dies reduzierte die Gesamtdauer des Assays auf dreieinhalb Stunden nach der DNA-Extraktion. (3) Für die Genotypisierung waren 1000 Genomäquivalente als Eingangsmaterial für die PCR ausreichend. (4) Schließlich wurde gezeigt, dass eine Mischpopulation aus zwei *fimH*-Genotypen bis zu einem 50fachen Überschuss der einen Variante aufgelöst werden konnte.

Summary

Background

Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains are the major cause for a variety of diseases such as septicemia, neonatal meningitis, and a range of urinary tract infections. In comparison to commensal strains, the genomic DNA of pathogenic strains contains additional information for prominent virulence factors, e.g. toxins, invasins, capsule proteins, adhesins and siderophors. As an important fact, pathoadaptive mutations are also capable of increasing the pathogenic potential of these bacteria. This phenomenon has been primarily described for FimH, the binding subunit of Type 1 fimbriae. These adhesive structures of *E. coli* play an important role during the infection process and mediate the interaction between the bacterium and mannose-containing glycoprotein structures (Uroplakin) on the host cell epithelium. This is considered to be the first step of the *E. coli* colonization of the lower urinary tract. But Type 1 fimbriae are also involved in subsequent processes such as autoaggregation, biofilm formation and invasion of the host cell. In addition, the expression of Type 1 fimbriae may facilitate biofilm formation on abiotic surfaces and the colonization of urinary catheters. This is a profound problem for catheterized patients in hospital. Studies have identified natural as well as randomly engineered variants of *fimH* which differ only by a single mutation. As a consequence of this, their adhesive characteristics are altered. Whilst all variants are capable of binding trimannose structures, they vary in their ability to bind monomannose residues and also non-carbohydrate receptors such as type I and type IV collagen, laminin and fibronectin. In conclusion, pathoadaptive mutations shift the tropism of the ExPEC *fimH* variants towards receptors that are found on the surface of the cells of the urinary tract epithelium.

In human health care, an emerging concern regarding microbial infections is antibiotic resistance among pathogenic microorganisms. Fluoroquinolones are first-choice antimicrobial agents for patients suffering from urinary tract infections and are recognized as some of the most consumed antibacterial agents world-wide. Significantly, during the last 15 years, a variety of fluoroquinolone resistance mechanisms have evolved, which has resulted in a Ciprofloxacin resistance rate of 21.9 % among *E. coli* clinical isolates in Germany (study by Paul-Ehrlich-Gesellschaft from 2004, <http://www.p-e-g.org/>). Resistance mechanisms include single mutations within the quinolone resistance determining region (QRDR) of the target genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* which hamper the interaction between drug and target. Further mechanisms encompass a decreased uptake due to impermeability of the membrane, an overexpression of efflux pump systems, and a genetic variant of an aminoglycoside modifying enzyme which was discovered in *E. coli* isolates in China. This latter enzyme converts and thereby inactivates fluoroquinolones by chemical modification. Recently, the presence of plasmid-borne quinolone resistance genes *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* on plasmids has been described. These gene products interact with the QRDR of GyrA resulting in the inactivation of the antibiotic. Predominant mutations at two critical positions of GyrA (S83 and D87) are known to be required for the expression of mutations within the other targets genes and for the functionality of protective plasmid-encoded proteins; therefore, they can be regarded as the first

step of a successive accumulation of resistance mechanisms, which lead to high-level and clinical relevant resistance to fluoroquinolones.

The simultaneous assessment of antibiotic and virulent properties is a key element for the detection of pathogenic variants. Several studies have shown that the microarray format is a suitable technology for the verification of the presence or absence of certain genes in *E. coli*. Significantly, however, a simultaneous genotyping of *E. coli* genes contributing to antibiotic resistance or virulence by allele specific hybridization has not been published so far. The first aim of this study was to develop a fast and robust microarray assay based on allele specific hybridization in order to detect the most frequently occurring pathoadaptive mutations in *fimH*. This microarray was used to perform a systematic study of 10 reference strains, 50 blinded clinical samples and the ECOR collection in order to get a deeper insight into the distribution of *fimH* variants amongst the phylogeny of *E. coli*. In a second step, the previously described *gyrA* microarray was revised and integrated into the *fimH* microarray for the simultaneous detection of mutations within *gyrA*. These mutations are the primary cause for quinolone resistance. The final aim of this study was to demonstrate that the incorporation of a mismatch specific endonuclease into the assay is capable of contributing to a more specific genotyping.

Detection of pathoadaptive mutations with a DNA microarray

To initiate the process of the probe design, the DNA sequence of *E. coli* MG1655 *fimH* was used as a template for a homology search in GenBank. This enabled the identification of relevant DNA sequences and, as a consequence, an insight into the frequency of variable positions within *fimH*. In this context, 70 DNA and 90 protein sequences were analyzed. Additional mutations which had been found in different literature sources or had been identified by our own sequencing experiments were also considered for the probe design. In conclusion, 26 FimH mutations (T9A, V27T, V27A, N33H, Q41K, I42T, S62A, G66S, G66C, G66D, N70H, N70S, G73E, T74I, K76E, S78N, P111L, V118L, A119V, N135K, G159S, V163A, R166C, R166H, Y195F and A202V) were taken into account for the design of specific capture probes whereas no silent mutation was considered. In conclusion, this resulted in an array dimension of 364 spots (Figure 1). For the amplification of the relevant *fimH* gene, new primers had to be designed as previously published primers yielded an unacceptable quantity of unwanted byproducts, even when using higher annealing temperatures during PCR.

Primary hybridization experiments with the *fimH* microarray using *fimH* variants of *E. coli* K12 reference strains MG1655 and W3110 in order to find appropriate hybridization conditions yielded the following parameters for further experiments: hybridization for 2 h at 50 °C with a reduced salt concentration of 2x SSPE and 0.001 % SDS as an additive (Figure 2). After validating the feasibility of the array with nine additional *fimH* variants of diverse *E. coli* samples the microarray was used for screening 50 clinical samples and 72 strains from the ECOR collection which represent the broad range of *E. coli* genetic variety. Two of the ECOR isolates, ECOR13 and ECOR22, proved to be *fimH* negative. In addition, all *fimH* variants were sequenced and by comparing the data only five additional mutations were discovered in these strains which had not been described previously (P102K, V106A,

Summary

V163I, and V163F) or had not been considered for the capture probe design due to issues of low abundance (E117K). Overall, 16 of the 26 polymorphisms that had been taken into account for the development of the microarray could be validated by screening the isolates. It is noteworthy to mention that sequencing proved that ECOR06 carried a *fimH*:IS1 variant in which an IS1 transposon element is integrated into the *fimH* gene with the consequence that *fimH* is not functional any more. This variation was hereby described for the first time.

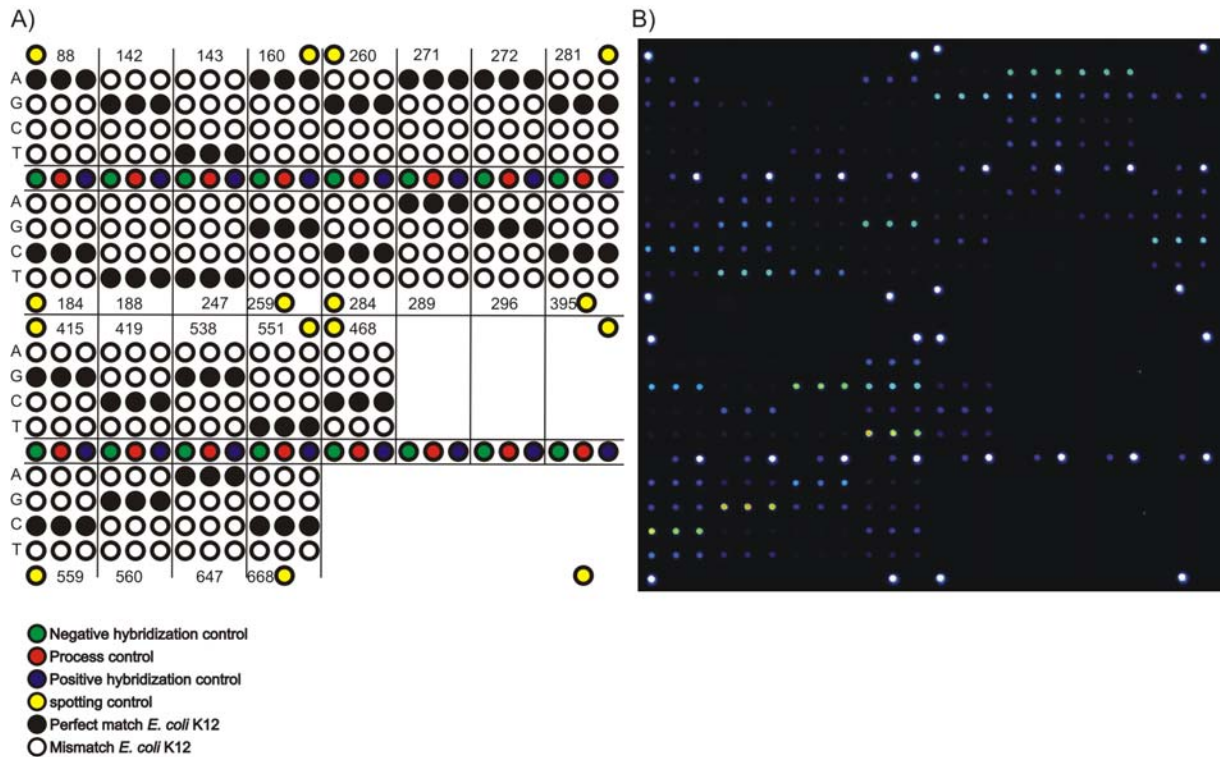


Figure 1: Layout of the *fimH* genotyping microarray (A). Each position (88, 142, ..., 668) is covered by a set of four allele specific probes which were spotted in triplicates. All respective PMs of reference strain *E. coli* MG1655 are shown in black circles. (B) Fluorescence image of a hybridization experiment using the *fimH* derived target DNA of *E. coli* MG1655.

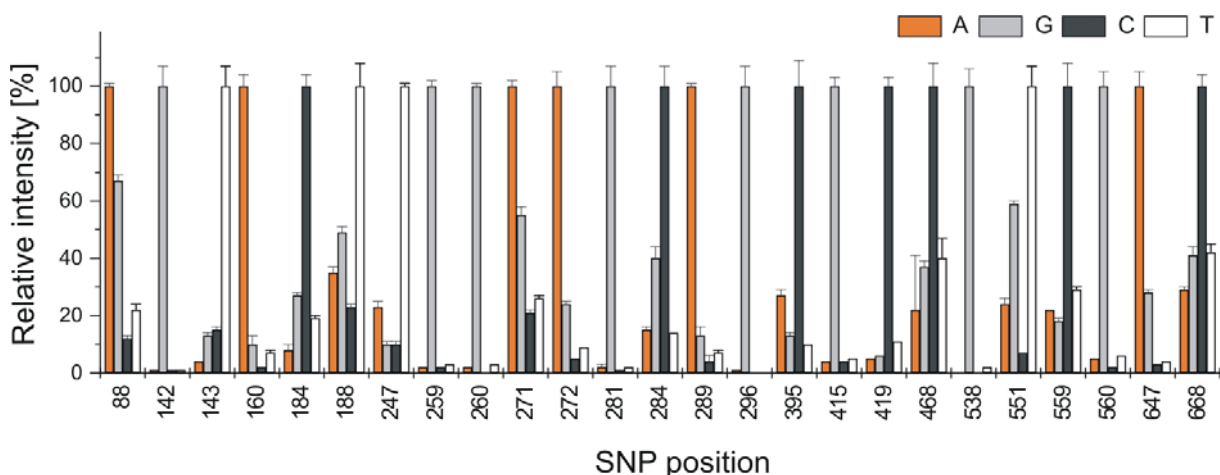


Figure 2: Overview of relative intensities and standard deviations (n = 9 (3 replicates x 3 arrays)) of all 25 sets of allele-specific probes of a preliminary experiment with *E. coli* MG1655.

In addition, an alignment of all *fimH* sequences was performed which yielded a phylogenetic tree of 130 *fimH* variants. The data from these experiments suggest that all of the distinct mutations occur in combination with the predominant mutation V27A. Significantly, however, no clear correlation between *fimH* variants and symptoms caused by the infection could be shown. Some *fimH* mutation patterns were correlated with the respective phylogenetic group. (1) The mutation A202V could only be found within strains of group A, which represent commensal and benign *E. coli* strains. (2) The double mutation V27A / G66C was found only amongst group D members. (3) Also, all 13 strains of the serotype O153:H31 showed the same mutation pattern V27A / Q41K, a phenotype that had not been discovered before. (4) Above all, most strains from group B2 can be clearly distinguished from the other groups by the distinctive mutation S78N, and, to a lesser extent, by N70S. These mutations have the potential to be specific markers for group B2, which is mainly composed of pathogenic *E. coli* strains. The *fimH* sequences of the 70 ECOR variants were published in GenBank and are accessible by the numbers EF192321 to EF192390; in detail the ECOR6 *fimH*:IS1 variant can be found under the accession number EF192326.

Alongside these screening experiments which provide an insight into the phylogeny of the evolution, some investigations relating the developed assay were undertaken. The sensitivity of the system was determined by diluting the template DNA of reference strain *E. coli* MG1655 before amplification. After hybridizing the complete amount of labeled PCR product an unambiguous discrimination could still be performed when using 5 pg of DNA as a template. This is equal to 10^3 genomic equivalents. In comparison, a clinical sample will usually be diagnosed as an urinary tract infection if the cell density is higher than 10^5 cells per ml without considering the respective pathogenic background of the strain. In order to enhance the speed of the assay, a reduction of amplification and hybridization time was investigated. When using a shortened PCR program of 22 minutes (18 cycles of 10 s denaturation, 10 s annealing and 20 s elongation), a precise identification of the relevant *fimH* positions could still be carried out without any loss of discrimination. By hybridizing for only one hour, all *fimH* positions were correctly identified with an acceptable loss of discrimination. In summary, this complete assay has the potential to be performed in less than four hours after DNA extraction: 30 min of PCR, 15 min of purification of the PCR product, 30 min of unspecific fragmentation, 60 min of hybridization, 30 min of washing and 15 min of data acquisition. Considering a maximum of 30 additional minutes for handling steps, a protocol can be obtained which lasts around three and a half hours.

A detailed examination of a set of 20 strains, which had been investigated in parallel to the above study, revealed a clear correlation between the incorporation rate of the fluorescent Cy3 dye and absolute signal intensity. Significantly, however, the incorporation rate has no effect on the discrimination of the allelic variations. In relation to the influence of silent mutations, a significant loss of the absolute intensity of the probe-target hybrid of up to 96 % was observed when the mutation was adjacent to the critical position of interest. Notably, however, this did not have any effect on the discrimination between perfect match and mismatch probes. Whereas most of the capture probes showed a similar MM to PM ratio, two sets of probes (184 and 546) showed a significantly better discrimination. Only one set (position 246) revealed a worse discrimination. Overall, these results suggest that the silent

Summary

mutations do not have a great influence on strain discrimination and may be excluded from the probe design.

An analysis of a mixed bacterial population, simulated by mixing the genomic DNA of two different isolates before the amplification step, revealed that the genotype of two different strains can be identified in a single assay down to a ratio of 50:1 (and vice versa). Although the detection of a broader range of mixed samples is desirable for real samples, the microarray sets up the opportunity of analyzing population dynamics in a small range. This aspect is albeit critical as the coexistence of pathogenic and asymptomatic strains can be observed.

The visual inspection of microarray spots is time-consuming and error-prone and an automatic quality filtering based on the processing of the raw data improves data analysis approaches. In order to find an appropriate parameter for this critical step, a range of algorithms were tested. Specifically, CV_{Spot} , the mean-to-median correlation coefficient (MMCC) and three different quality scores (q) were calculated and compared to 3D spot morphology. Whereas no conclusion between MMCC, q and spot irregularities could be drawn, the data of this study suggest that the employment of CV_{Spot} , the ratio between standard deviation and mean value of the pixel intensities, is a straightforward measure for good spot quality. In detail, most acceptable spots possessed a CV_{Spot} of less than 0.3 and a cut-off value of 0.4 was accepted.

Integration of a microarray for the detection of quinolone resistance

As a first step in the development of a simultaneous detection of *fimH* and *gyrA* mutations, the previously developed *gyrA* microarray had to be revised as a result of recently published sequences. New primers for the amplification of the *gyrA* QRDR and a new process control for controlling the hybridization experiment were designed and the capture probes were adapted to the thermodynamic parameters of the *fimH* microarray. In addition, due to discovered minor relevance of some previously spotted probes, the size of this array was reduced to only six sets of different capture probes which covered three relevant positions (248, 259 and 260) and two frequent silent mutations (252 and 255). Validating these newly developed oligonucleotides by means of hybridizing experiments with *gyrA* variants of ten reference strains, three different missense mutations and both silent mutations could be confirmed. Furthermore, these capture probes proved to possess an outstanding discrimination potential.

The *fimH* microarray and the *gyrA* microarray were integrated resulting in a microarray of 462 spots (Figure 3). By means of separate hybridization experiments of the MG1655 *fimH* and *gyrA* PCR products, false positive signals due to cross hybridizations were calculated. In case of the *fimH* microarray, most of the probes had a false positive fluorescence signal obtained by *gyrA* of no more than one percent of the signal obtained by *fimH* target DNA. Only capture probes of positions 281, 289 and 296 showed signals between two and five percent. In case of the *gyrA* microarray, the cross hybridizations of *fimH* were determined to be between 0.7 %

and 8.9 % of the signal obtained by *gyrA*. In summary this data indicate that the feasibility of this assay is not hampered significantly by false positive signals.

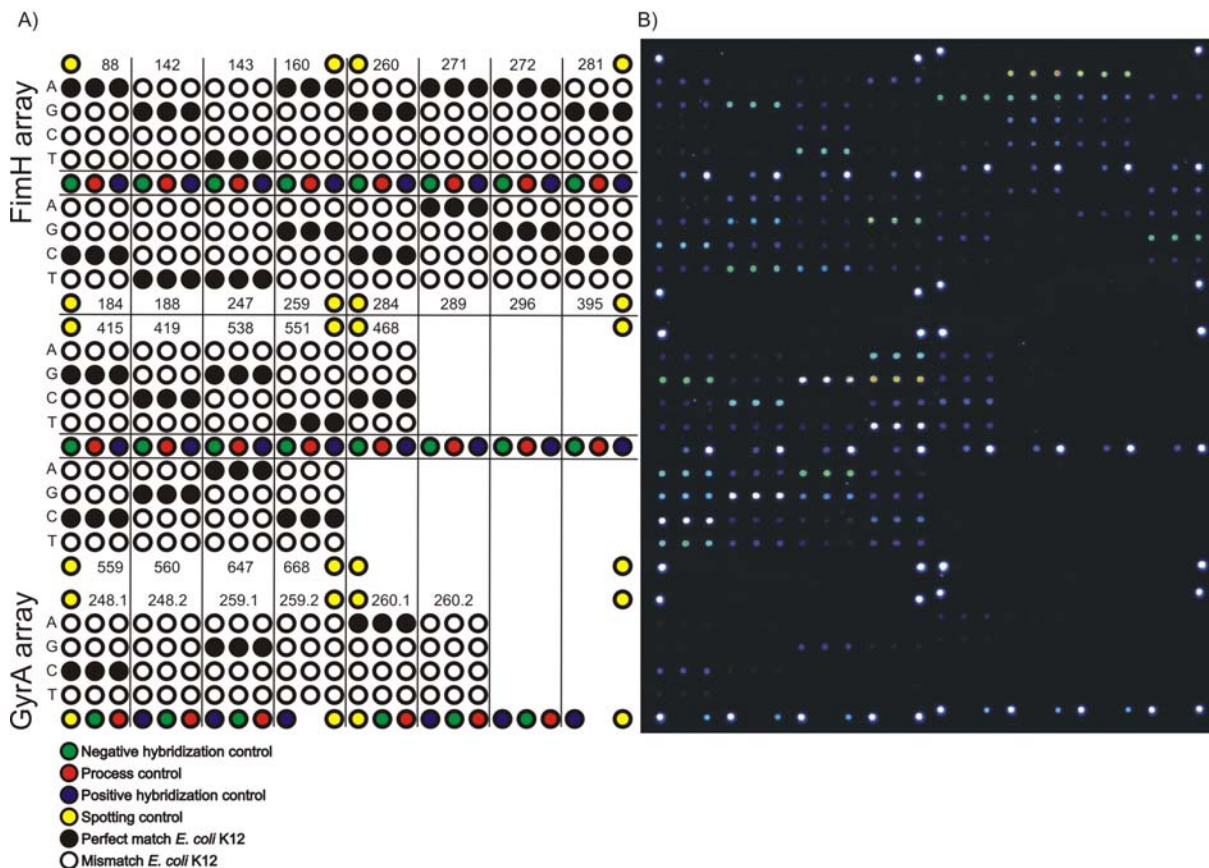


Figure 3: (A) *gyrA/fimH* microarray layout. Each position is covered by a set of four probes which were spotted in triplicates. All respective PM probes corresponding to the reference strain *E. coli* MG1655 are shown in black circles. (B) Fluorescence image of a *gyrA/fimH* microarray after a hybridization experiment using *fimH* and *gyrA* derived target DNA of *E. coli* MG1655.

Finally, *fimH* and *gyrA* were simultaneously amplified in a single PCR. By using a 2.5:1 excess of *fimH* primers, both PCR products were synthesized in approximately equal amounts. After hybridization to the integrated array, the discrimination between mismatch and perfect match probes was not significantly lower and all positions were identified correctly. The study then proceeded to the investigation of *fimH* and *gyrA* variants of all 50 clinical *E. coli* samples and 70 ECOR strains. In addition, the *gyrA* variants of isolates U25216, ECOR13 and ECOR22, which had proven to be *fimH* negative, were examined with this array. For validation, all *gyrA* QRDRs were also sequenced. Comparing the data of this combined microarray with the results obtained with the *fimH* microarray, no discrepancy for the *fimH* variants could be observed. In relation to the *gyrA* variants, a total of 20 out of 51 clinical samples proved to have at least one mutation within the respective QRDR. Whereas all 13 isolates of the serotype O153:H31 contained the double mutation S83L / D87Y, five isolates had the double mutation S83L / D87N, one isolate proved to have the mutation S83L and another isolate had the single mutation D87N. These mutations are sufficient for a significantly increased MIC towards fluoroquinolones and bear the potential of high resistance by the acquisition of additional resistance mechanisms. It is noteworthy that within the ECOR collection, no amino acid exchange was discovered; this is not surprising as the ECOR collection was well established before

Summary

the introduction of fluoroquinolones as an antibiotic drug. Comparing the sequencing results with the data obtained by hybridization, no further relevant mutation within the QRDR could be identified. Interestingly, only isolates taken from patients suffering from urinary tract infections were shown to bear a quinolone resistance mutation, whereas all asymptomatic isolates, fecal isolates and the avian pathogenic strain AC/1 did not contain any mutation. Finally, it was found that the wild type variant at position 255C could only be identified in strains of phylogenetic group A (24/31 = 77.4 %). The silent mutation 255T was, however, found in all strains of groups B1, B2, D and E. The wild type variant has, therefore, the potential to be a specific phylogenetic marker for ECOR group A.

Six clinical isolates which had proven to be quinolone resistant were examined of which two were *fimH* negative. Two isolates contained the single *fimH* mutation V27A; which can not be attributed to a phylogenetic group. One isolate had the double mutation V27A / R166H, which can be referred to phylogenetic group B2, and the mutation pattern V27A / Y195F, which is significant for group A, was found in the

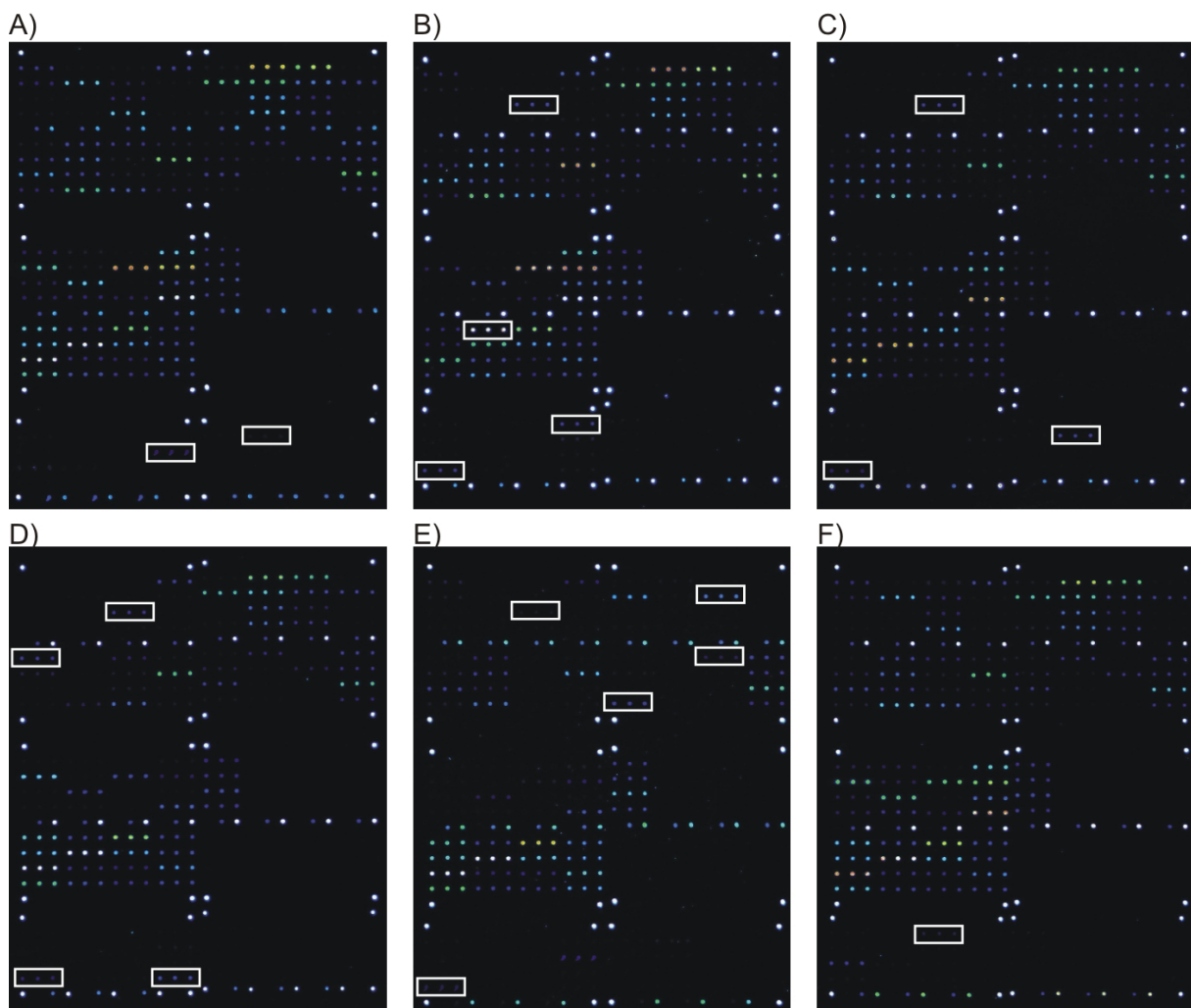


Figure 4: Microarray images showing the identification of six different allelic variants of *fimH* and *gyrA*. Hybridization with labeled *gyrA/fimH* PCR products of (A) *E. coli* AC/1 (FimH: no mutation; GyrA: 83S/87D), which differs from the reference sequence in the silent mutation C255T, (B) UR1469 (V27A/R166H; 83L/87N), (C) UR1520 (V27A; 83L/87G), (D) U12740 (V27A/Q41K; 83L/87Y), (E) F11 (V27A/N70S/T74I/S78N; 83L/87D) and (F) DH5 α (no mutation; 83S/87N). The white boxes indicate the probes that identify these mutations.

last isolate. Concerning the results from the *gyrA* subarray, all isolates contained the mutation S83L and an additional mutation at position 87. Whereas only one isolate contained a glycine unit, all other isolates showed an asparagine at this position. Therefore, the phenotypic resistance of these six isolates can be unambiguously assigned to alterations in the QRDR of all *gyrA* variants.

Finally, the genomic DNA of laboratory strain DH5 α was investigated; this is annotated as *gyrA96* and as quinolone resistant due to a mutation within the *gyrA* gene. But no further information about the *gyrA* sequence is available. The respective hybridization experiment implied a single mutation within the QRDR of DH5 α *gyrA* at position 87, namely an alteration from aspartic acid to asparagine, which is sufficient for quinolone resistance. Overall, six different *gyrA* variations could be identified in all isolates by means of this microarray (Figure 4)

Employment of a mismatch specific endonuclease

Genotyping by means of allele specific hybridization suffer from the drawback that different oligonucleotide probes with different nucleotide composition have varying thermodynamic parameters. This results in unpredictable hybridization behavior of mismatch probes. In consequence, the discrimination between perfect match and mismatch probes is insufficient for some sets of probes. The detection of mixed samples can, in consequence, not be resolved properly. This is why the incorporation of a mismatch specific endonuclease was tested in this study. This specifically digests false-positive hybrids, and, as a consequence, improves the discrimination between perfect match and mismatch probes.

In order to demonstrate the activity of the commercially available Surveyor Nuclease, four allele specific probes, which had been hybridized to a fluorescently labeled artificial target, were incubated with the enzyme. This set of probes had been used for the development of a prototype of the *fimH* microarray and had been rejected due to insufficient discrimination power. In addition, the enzyme's effect on a fluorescently labeled single stranded DNA (spotting control) as well as its effect on a perfect match hybrid (positive hybridization control) were investigated. It was found that Surveyor

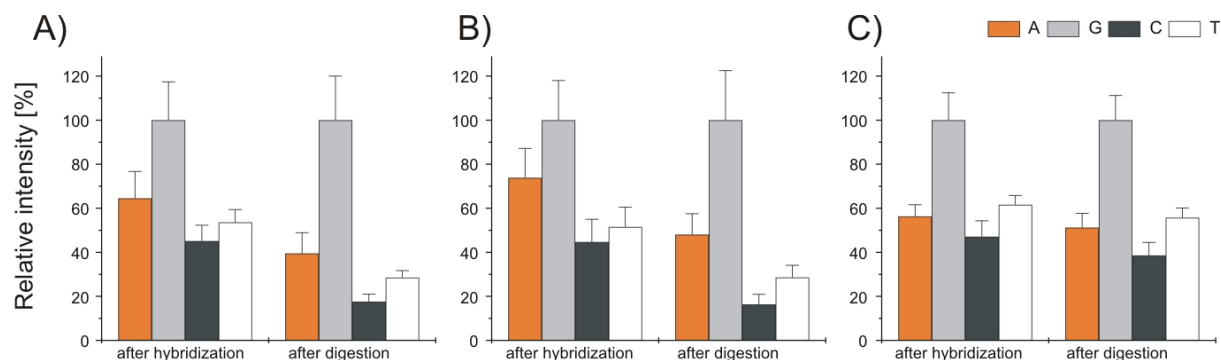


Figure 5: Relative fluorescence signals of the capture probes after hybridization and digestion, respectively. Here, the results of the experiments with (A) nuclease & enhancer, (B) only the nuclease and (C) only *Taq* buffer as a negative control are shown.

Summary

nuclease possesses a negligible activity for single stranded DNA (7.6 % net reduction of fluorescence signal) and a striking activity for homoduplexes (26.5 % net reduction for the positive hybridization control and 28.0 % net reduction for the G-C hybrid). Notably, the enzyme's activity for heteroduplexes was significantly higher (36.8 % net reduction for the A-C hybrid, 43.4 % net reduction for the C-C hybrid and 40.7 % net reduction for the T-C hybrid). In addition, no significant improvement of the enzyme's activity could be observed when an enhancer, which was provided by the supplier, was added to the digestion mixture (Figure 5).

Conclusion and outlook

In summary, the *gyrA/fimH* microarray was successfully tested with 141 *E. coli* samples. The results of the *fimH* subarray indicated a correlation between *fimH* mutation pattern and phylogenetic background. In addition, it was shown that two *fimH* positions (S62A and N135K) were potential diagnostic markers for MNEC strains and serotype O157:H7, respectively. The mutations identified by the *gyrA* subarray enabled the detection of quinolone resistant isolates. This is particularly significant as a fast and robust determination of resistance properties enables a prospective and appropriate antibiotic treatment of urinary tract infections. In future studies, probes for genotyping new target genes (*icdA*, *polP*, *fumC*,...) will contribute to an unambiguous phylotyping of *E. coli*. In addition, new probes covering virulence genes (*pap*, *hlyA*, *cnf*,...) will provide more information about the respective pathotype. Such an extended microarray would be useful for point-of-care application.

The employment of the mismatch specific endonuclease was a promising first step towards an enhanced microarray-based genotyping. Furthermore, this approach should have the potential to contribute to a label-free assay. Significantly, however, issues concerning (1) the length of the probes, (2) the spacer molecule and (3) the enzyme's activity for different mismatch pairings still have to be investigated.

1. Einleitung

1.1. *Escherichia coli* - auch ein pathogener Organismus

Escherichia coli ist einer der am besten verstandenen und analysierten Organismen und deshalb der Modellorganismus der Wahl für genetische und biochemische Untersuchungen sowie Stoffflusssimulationen. In der industriellen Anwendung wird *E. coli* für die Produktion von Metaboliten wie Aminosäuren oder von therapeutischen und kommerziellen Proteinen eingesetzt (Posfai et al. 2006). Zu dem großen Erfolg bei dem Einsatz von *E. coli* als Werkzeug in der Biotechnologie hat auch die Tatsache beigetragen, dass die genomische DNA von inzwischen zehn *E. coli*-Stämmen (Stand: August 2007) komplett sequenziert wurde und die Sequenzen größtenteils öffentlich zugänglich sind. Dazu gehören die beiden *E. coli* K12-Laborstämme MG1655 (GenBank No. U00096, (Blattner et al. 1997)) und W3110 (GenBank No. AP009048, (Riley et al. 2006)), die beiden enterohämorrhagischen O157:H7-Stämme EDL933 (GenBank No. AE005174, (Perna et al. 2001)) und Sakai (GenBank No. BA000007, (Makino et al. 1999)), der enteroaggregative Stamm O42 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/Escherichia_Shigella), die extraintestinal pathogenen Stämme CFT073 (GenBank No. AE014075, (Welch et al. 2002)), UTI89 (GenBank No. CP000243, (Chen et al. 2006)) und 536 (GenBank No. CP000247, (Hochhut et al. 2006)) sowie die beiden vogelpathogenen Stämme APEC O1 (GenBank No. CP000468, (Johnson et al. 2007)) und 789 AC/1 (Sequenz noch nicht zugänglich).

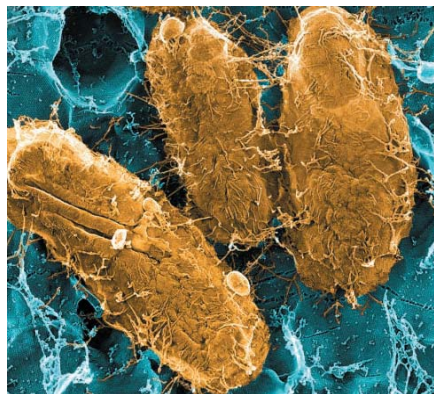


Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli*-Zellen an der luminalen Oberfläche von Blasenepithelzellen (Mulvey et al. 2000)

Kaum ein Mikroorganismus ist so vielseitig wie *E. coli*. Diese in erster Linie kommensalische Spezies kolonisiert den Gastrointestinaltrakt von Neugeborenen innerhalb weniger Stunden nach der Geburt, wobei *E. coli* und der Wirt normalerweise in beiderseitigem Nutzen koexistieren. Dabei besiedelt das Bakterium vor allem die Schleimschicht des Dickdarms von Menschen, anderen Säugern und Vögeln. *E. coli* wird als prototypische kommensalische Spezies der fakultativ anaeroben Darmflora angesehen und hat durch ihre Rolle als früher Modellorganismus in der Entwicklung der molekularen Biologie eine zentrale Funktion eingenommen, bei der fundamentale Aspekte der Genregulation aufgeklärt werden konnten (Kaper 2005). Kommensalische *E. coli* lösen nur in sehr seltenen Fällen Infektionen wie Peritonitis (Bauchfellentzündung) aus (Hau 1990). Betroffen

sind dabei in erster Linie Patienten, deren Immunsystem geschwächt oder deren intestinale Barrieren zum Beispiel durch Unfälle verletzt sind.

Daneben gibt es verschiedene pathogene *E. coli*-Varianten mit spezifischen Virulenzeigenschaften, die es ermöglichen, neue Nischen zu besiedeln und ein breites Spektrum an Krankheiten auszulösen. Diese zusätzlichen Attribute sind häufig auf genetischen Elementen kodiert, die mobilisiert werden und somit zu so genannten Pathotypen kombinieren. Im Allgemeinen können drei Syndrome durch solche Pathotypen ausgelöst werden: Gastrointestinalerkrankungen wie Gastroenteritis und Diarrhöe, verschiedene Infektionen des Urogenitaltrakts wie Prostatitis, unkomplizierte Zystitis (Blasenentzündung) und Pyeloniphritis (Nierenbeckenentzündung), sowie Sepsis/Meningitis. Zu den pathogenen Intestinalerregern gehören sechs distinkte Pathotypen: enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) und diffus adherente *E. coli* (DAEC). Dagegen werden *E. coli*, die extraintestinale Infektionen auslösen, als extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC) bzw. als uropathogene *E. coli* (UPEC) und meningitisassoziierte *E. coli* (MNEC) klassifiziert. Ein zusätzlicher Pathotyp, der vogelpathogene *E. coli* (APEC), löst in erster Linie in Geflügel Infektionen der Atemwege, Perikarditis (Herzbeutelentzündung) und Sepsis aus (Kaper et al. 2004; Russo und Johnson 2000).

Harnwegsinfektionen (HWI) gehören zu den häufigsten nosokomialen Krankheiten. Statistiken aus den Vereinigten Staaten besagen, dass jährlich etwa 180 Millionen Menschen weltweit bzw. alleine acht Millionen Menschen in den USA an einer der unterschiedlichen HWI erkranken und dass jede zweite Frau zumindest einmal in ihrem Leben von einer HWI betroffen ist (Mulvey et al. 2000). Dies verursacht jährliche Kosten alleine im amerikanischen Gesundheitssystem von etwa zwei Milliarden US Dollar (Hooton et al. 1996). In der ECO SENS-Studie (Abbildung 1-2) konnte gezeigt werden, dass in europäischen Ländern *E. coli* mit mehr als 75 % der Haupterreger vor allem bei unkomplizierten Blaseninfektionen ist (Kahlmeter 2000; Kahlmeter 2003), aber auch mit einem geringeren Anteil bei schwerwiegenden

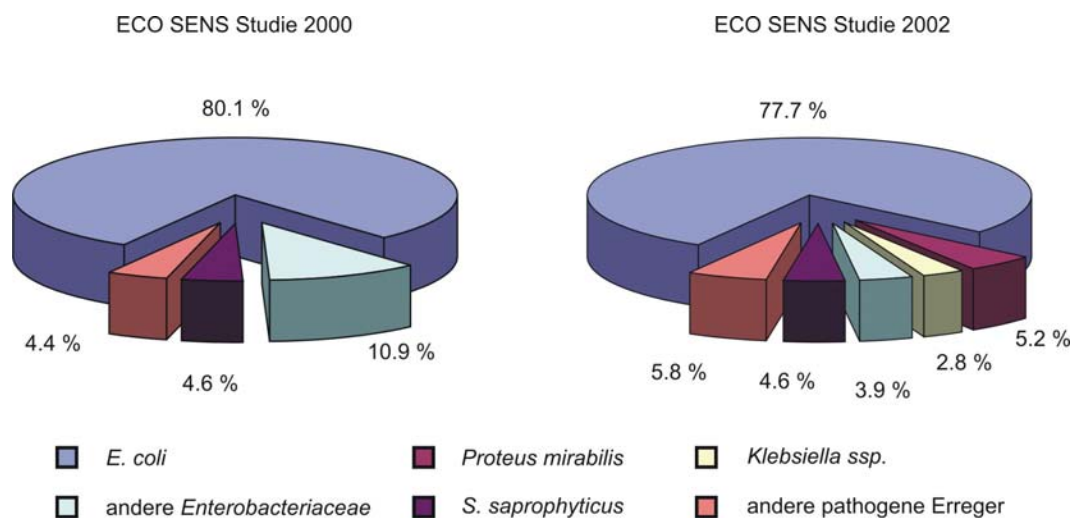


Abbildung 1-2: Verteilung der Erreger von Harnwegsinfektionen nach den Ergebnissen der ECO SENS-Studie aus den Jahren 2000 und 2002 (Kahlmeter 2000; Kahlmeter 2003).

Infektionen der Niere, die bis zur Sepsis führen können. Dagegen machen andere *Enterobacteriaceae* etwa elf Prozent (im Jahr 2000: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* und *Morganella morgani*; im Jahr 2002 sind *Proteus mirabilis* und *Klebsiella spp.* gesondert aufgeführt), *Staphylococcus saprophyticus* weniger als fünf Prozent und „andere pathogene Erreger“ (andere *Staphylococcus spp.* und *Enterococcus spp.*) zusammen fünf Prozent bei den Harnwegsinfektionen aus. Während andere Erreger bei Betroffenen auftreten, die oftmals abnormale Harnwege aufweisen, die sie für Infektionen anfällig machen, befallen *E. coli* auch Patienten ohne systemische Prädispositionen (Mühdorfer et al. 2001).

1.2. Virulenzfaktoren in ExPEC

Der hauptsächliche Unterschied zwischen kommensalischen und pathogenen Varianten von *Escherichia coli* ist die Fähigkeit der pathogenen Erreger, so genannte Virulenzfaktoren zu exprimieren. Diese verleihen dem Bakterium eine erhöhte Fitness, vermitteln die Kolonisierung und anschließende Invasion spezifischer Wirtszellen, erlauben es, das Immunsystem des Wirtes zu umgehen und stimulieren in diesem eine inflammatorische Antwort. Zu diesen Virulenzfaktoren gehören unter anderem Endo- und Exotoxine, spezifische Adhäsine, Proteine, die bei der Synthese von Kapselstrukturen (Proteine oder Polysaccharide) beteiligt sind, und so genannte Siderophore, die zu einer erhöhten Eisenaufnahme beitragen. In Tabelle 1-1 sind einige der Virulenzfaktoren aufgeführt, die im Zusammenhang mit extraintestinal pathogenen *E. coli* beschrieben wurden.

Spezifische Adhäsionsfaktoren dienen in erster Linie der Kolonisierung von Orten, an denen *E. coli* normalerweise nicht leben kann. So wird die Besiedlung der unteren Harnwege wie bspw. der Blase vor allem mit der Expression der P- und Typ 1-Fimbrien in Verbindung gebracht. Dies stellt den ersten Schritt des Infektionsprozesses dar. Außerdem können dadurch die Invasion der Wirtszellen im Blasenepithelium und die Biofilmbildung gefördert werden; dieser Zustand wird als internes Reservoir für wiederkehrende Infektionen angesehen (Kaper et al. 2004). Durch Ausbildung von Biofilmen können sich Mikroorganismen vor Antikörpern oder Makrophagen schützen, horizontal Gene transferieren, und sie sich zusätzlich Schutz gegenüber Antibiotika geschützt. Dagegen wird für die Infektion der oberen Harnwege die Expression von S-Fimbrien und Adhäsine der Dr Familie in Verbindung gebracht.

Die große Gruppe an unterschiedlichen Toxinen setzt sich aus zwei Klassen zusammen. Zu den so genannten Exotoxinen gehören lösliche Proteine, die gewöhnlich in das umgebende Medium sekretiert werden und Wirtszellen schädigen oder zerstören können. So bilden Hämolyse wie das Alpha-Hämolyse Poren in einer eukaryotischen Membran, was eine Lysis der betroffenen Wirtszelle auslöst (Johnson 1991). Dahinter steckt eine Strategie, die es ermöglicht, in nährstoffarmer Umgebung die Versorgung an erforderlichen Nährstoffen wie Eisen zu garantieren. Ein weiteres Beispiel ist das *cytolethal distending toxin*, das eine DNase-Aktivität besitzt und die Wirtszelle in der G2/M-Phase des Zellzyklus blockieren kann.

Tabelle 1-1: Übersicht über einige prominente Virulenzfaktoren, die in extraintestinal pathogenen *Escherichia coli* nachgewiesen wurden

Faktor	Gen bzw. Gencluster	Referenz
<i>Adhäsine</i>		
Dr adhesins family	<i>drb, afa</i>	(Johnson 1991)
P fimbriae	<i>pap, prs</i>	(Johnson 1991)
Typ 1 fimbriae	<i>fim</i>	(Johnson 1991)
S fimbriae	<i>sfa</i>	(Johnson und Russo 2005)
F1C fimbriae	<i>foc</i>	(Johnson 1991)
Outer membrane protein A	<i>ompA</i>	(Kaper et al. 2004)
Invasion protein	<i>lbeA</i>	(Kaper et al. 2004)
Curli	<i>csg</i>	(Kaper et al. 2004)
Nonfimbrial adhesin type 1	<i>nfa</i>	(Bekal et al. 2003)
M-agglutinin	<i>bma</i>	(Bekal et al. 2003)
<i>Fitnessfaktoren</i>		
K antigen capsule protein	<i>neu</i>	(Johnson 1991)
Yersiniabactin	<i>fyuA</i>	(Kaper et al. 2004)
Siderophore receptor	<i>ireA</i>	(Kaper et al. 2004)
Siderophore receptor	<i>iroN</i>	(Kaper et al. 2004)
Haemin receptor	<i>chuA</i>	(Johnson und Russo 2005)
PTS system	<i>malX</i>	(Dobrindt et al. 2003)
<i>Toxine</i>		
Cytolethal distending toxin	<i>cdt</i>	(Kaper et al. 2004)
Haemoglobin-binding protease	<i>tsh</i>	(Kaper et al. 2004)
Autotransporter toxin	<i>sat</i>	(Kaper et al. 2004)
Alpha-hemolysin	<i>hylA</i>	(Johnson 1991)
Cytotoxic necrotizing factor	<i>cnf1</i>	(Kaper et al. 2004)
Aerobactin	<i>iutA</i>	(Johnson 1991)

Schließlich kann der zytotoxische Nekrotisierungsfaktor CNF kritische Glutaminreste in Signalmolekülen der Wirtszelle desaminieren, was zu zytoskeletalen Veränderungen, Vervielfältigung der Kernzahl und ausartendem Zellwachstum mit Nekrosis führt (Kaper et al. 2004). Dagegen bilden toxische Untereinheiten von Lipopolysacchariden auf der Oberfläche der äußeren Bakterienmembran die Gruppe der Endotoxine, die bei absterbenden Zellen freigesetzt werden und unter anderem einen septischen Schock auslösen können (Hau 1990).

Andere Oberflächenstrukturen setzen sich aus polymerisierten Polysacchariden zusammen, die ein Art Kapsel bilden und mit nichtspezifischen Abwehrmechanismen des Wirtes interagieren. So wird die K1-Kapselstruktur direkt mit Meningitis bei Neugeborenen in Verbindung gebracht (Kim et al. 1992). Eine wichtige Rolle im Infektionsprozess nehmen Siderophore wie beispielsweise IroN ein, die für eine erhöhte Eisenaufnahme der Zelle sorgen; dies ist von entscheidender Bedeutung, da Eisenionen oftmals an Orten der extraintestinalen Infektionen limitierend ist (Sorsa et al. 2003). Dieser kleine Ausschnitt der Vielfalt an Virulenzfaktoren verdeutlicht, wie vielseitig die Mechanismen sind, die *E. coli* entwickelt hat, um möglichst effektiv neue Nischen außerhalb des Dickdarms zu besetzen und dort ein breites Spektrum an Krankheiten auszulösen.

Oftmals sind solche Virulenzfaktoren in so genannten Pathogenitätsinseln kodiert (Hacker und Kaper 2000). Dabei handelt es sich um größere Bereiche (10 bis 200 kbp) in der genomischen DNA von pathogenen Varianten, die sich oft durch einen vom Kerngenom unterschiedlichen GC-Gehalt auszeichnen. Dies und andere Indizien weisen darauf hin, dass diese Regionen durch horizontalen Gentransfer generiert wurden (Hacker et al. 2003). So konnten in dem uropathogenen Stamm 536 insgesamt vier solcher Pathogenitätsinseln nachgewiesen werden (Dobrindt et al. 2002), die etwa fünf Prozent der gesamten genomischen DNA dieses Erregers ausmachen und insgesamt 13 verschiedene Virulenzfaktoren beinhalten, darunter Alphahämolysin und S-Fimbrien.

Zahlreiche Studien haben sich mit den Unterschieden von Mustern an Virulenzfaktoren in klinischen Isolaten auseinandergesetzt (Bingen et al. 1997; Katouli et al. 2005; Obata-Yasuoka et al. 2002; Ruiz et al. 2002). Jedoch konnten bislang keine eindeutigen Pathotypen identifiziert werden, auf die die unterschiedlichen Symptome zurückgeführt werden können (Kaper et al. 2004).

1.3. Typ 1-Fimbrien

Zu den am häufigsten vorkommenden adhäsiven Strukturen in *E. coli* gehören Typ 1-Fimbrien (Mulvey 2002), die von mehr als 80 % aller *E. coli*-Stämmen, aber auch von anderen *Enterobacteriaceae*n wie bspw. *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* und *Klebsiella pneumoniae* exprimiert werden. Diese Adhäsine vermitteln die Interaktion von dem pathogenen Organismen mit mannosehaltigen Glykoproteinstrukturen des Wirtsepitheliums, das als Uroplakin bezeichnet wird (Wu et al. 1996; Zhou et al. 2001), Neutrophilen, Makrophagen (Bar-Shavit et al. 1980), sekretorischem Immunoglobulin A (Wold et al. 1990) und Tamm-Horsfall-Protein (Pak et al. 2001). Dieses in den Harnwegen dominierende Glykoprotein nimmt dabei eine Schlüsselfunktion in der Prävention der Besiedlung der Harnwege durch *E. coli* ein. Zwar spielen die Typ 1-Fimbrien bei der Kolonisierung des Dickdarms keine Rolle (McCormick et al. 1989), dafür vor allem aber im Infektionsprozess der unteren Harnwege, vor allem bei Zystitis (Gunther et al. 2001), da der *fimAICDFGH*-Gencluster zumindest im Mausmodell während einer Infektion deutlich hochreguliert ist (Snyder et al. 2004) und *E. coli* eine höhere Persistenz in den Harnwegen verleiht.

Als Konsequenz der Adhäsion werden Abwehrkaskaden durch den Wirt aktiviert, zum Beispiel als Abstoß von Blasenepithelzellen, als inflammatorische Antwort (Connell et al. 1996; Mulvey et al. 1998; Mysorekar et al. 2002) oder als Unterdrückung einer NF- κ B-Produktion und dadurch einer Förderung der induzierten Apoptose (Klumpp et al. 2001). Zusätzlich ist auch die Stimulierung von potenten Mastzellen durch Typ 1-Fimbrien nachgewiesen (Malaviya et al. 1994). *E. coli* kann diesen Wirtsreaktionen teilweise ausweichen, indem zusätzlich Prozesse, an denen Typ 1-Fimbrien beteiligt sind, in Gang gesetzt werden. Dazu gehören die Invasion der Wirtszelle (Justice et al. 2004; Martinez et al. 2000) und die Fähigkeit zur Autoaggregation (Schembri et al. 2001a). Arbeiten an dem asymptomatischen Stamm 83972 und isogenen Mutanten weisen jedoch darauf hin, dass Typ 1-Fimbrien für die dauerhafte Persistenz in den Harnwegen nicht essentiell sind (Hull et al. 2002). Schließlich kann die Expression der Typ 1-Fimbrien die Biofilmbildung auf

abiotischen Oberflächen (Pratt und Kolter 1999; Schembri und Klemm 2001) und damit die Kolonisierung von Harnwegskathetern bzw. von katheterisierten Harnwegen erleichtern (Mobley et al. 1987), was vor allem für Patienten in Krankenhäusern ein ernst zu nehmendes Problem darstellt. Neben den diversen Harnwegsinfektionen werden Typ 1-Fimbrien auch mit anderen Infektionskrankheiten wie Meningitis bei Neugeborenen (Teng et al. 2005) und Morbus Crohn (Boudeau et al. 2001) in Verbindung gebracht.

Die Expression des *fimAICDFGH*-Genclusters wird von einem invertierbaren Promotorelement kontrolliert ('*fim switch*'). Die Inversion dieses 314 bp großen Schalterelements ist die Grundlage einer phasenvariablen Expression der Typ 1-Fimbrien, die zu einer heterogenen Population von phase-ON (mit Fimbrien) und phase-OFF (ohne Fimbrien) Zellen führt. Diese Schaltung wird durch die Rekombinasen FimE und FimB reguliert (Bryan et al. 2006). So wurden in Urin aus Patienten *E. coli*-Stämme isoliert, die keine Transkriptionsaktivität für Typ 1-Fimbrien aufwiesen (Lim et al. 1998). Typ 1-Fimbrien bestehen aus einem zylinderförmigen Mast, der von etwa eintausend Kopien von immunoglobulinähnlichen FimA-Untereinheiten gebildet wird, und kurzen Fibrillenstrukturen, die sich aus FimF-, FimG- und FimH-Untereinheiten an der Spitze der Fimbrien (Jones et al. 1995) zusammensetzen. Die weiteren Genprodukte des *fimAICDFGH*-Genclustern sind für die Biogenese der Typ 1-Fimbrien von entscheidender Bedeutung, wobei diese ebenso wie P-Fimbrien über einen Chaperone/Usher-Weg zusammengesetzt werden (Jones et al. 1993; Soto und Hultgren 1999; Vetsch et al. 2004). Dabei werden die N-terminalen Signalsequenzen (in FimH: 21 Aminosäuren) der strukturellen Untereinheiten während des Transports durch die innere Membran entfernt. Der weitere Transport von der periplasmatischen durch die äußere Membran hängt von spezifischen Assemblierungs- und Exportsystemen ab, die von den FimC- und FimD-Proteinen gebildet werden (Schembri et al. 2001b). Dabei formiert FimC einen proteinfaltenden Katalysator und verhindert die spontane Assemblierung von Untereinheiten im Periplasma (Vetsch et al. 2004). In ihrer gefalteten Form werden die immunoglobulinähnlichen Strukturen jeder Untereinheit durch eine

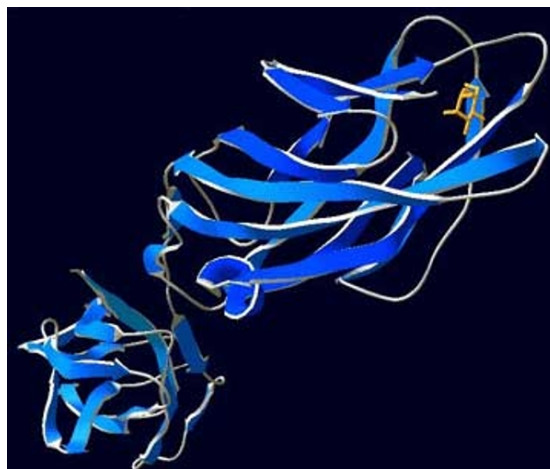


Abbildung 1-3: Darstellung der FimH-Untereinheit ((Hung et al. 2002); pdb-Entry: 1KLF). Dargestellt sind rechts die Lektindomäne (AS 1-156) mit der Bindetasche, die durch das orange gefärbte Mannosemolekül angedeutet wird, und links unten die Pilindomäne (AS 159-279).

aminoternale Ergänzung der nächsten Untereinheit komplettiert, ein Prozess, der als *donor strand exchange* bezeichnet wird (Choudhury et al. 1999; Sauer et al. 1999). Die FimH-Untereinheit, die zunächst aus 300 Aminosäuren und nach Prozessierung als 28 kDa-Protein aus 279 Aminosäuren besteht, vermittelt über ihre aminoternale Lektindomäne (AS 1-156) die Bindung der Fimbrien an mannosehaltige Rezeptorstrukturen (Krogfelt et al. 1990). Wie in Abbildung 1-3 dargestellt, liegt die hochkonservierte Bindetasche an der Spitze der FimH-Untereinheit dabei der carboxyterminalen Pilindomäne (AS 159-279) gegenüber, die für die Interaktion der FimH-Untereinheit mit den anderen Untereinheiten der Fimbrienstruktur verantwortlich (Choudhury et al. 1999) und dabei für die Funktionalität der Adhäsine unerlässlich ist (Orndorff et al. 2004). Die Struktur der FimH-Untereinheit wurde zunächst in einem Komplex mit dem FimC-Chaperon (Choudhury et al. 1999) und später zusätzlich mit D-Mannose aufgeklärt (Hung et al. 2002).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Serum aus Tieren, die mit FimH als potenziellem Vakzin geimpft wurden, die Bindung von *E. coli* an humane Blasenellen *in vitro* unterbindet und dass sowohl in einem Mausmodell als auch in Primaten die *in vivo* Kolonisierung durch die Immunisierung um 99 % reduziert wurde (Langermann et al. 1997; Wizemann et al. 1999).

1.4. Pathoadaptive Mutationen

Nicht nur das Vorhandensein oder die Abwesenheit (gain-of-function) bestimmter Faktoren, die in Abschnitt 1.2 beschrieben sind, kann die Virulenz eines Stammes signifikant beeinflussen. Auch zufällige Punktmutationen in vorhandenen Genen, die zu einem Aminosäureaustausch führen (change-of-function), können einen erheblichen Anteil an der Pathogenität des Bakteriums haben. Diese Mutationen werden als pathogenitätsadaptive (oder kurz als pathoadaptive) Mutationen bezeichnet und resultieren in erster Linie in einem Verlust der ursprünglichen Funktion des entsprechenden Gens; sie können aber auch zu einer Funktionsvariation führen (Sokurenko et al. 1999).

Mehrere Studien haben diese beiden Phänomene in unterschiedlichen Organismen nachgewiesen. So führen Mutationen des Gens *mucA*, dem negativen Regulator der Alginatbiosynthese, in *Pseudomonas aeruginosa* zu einer Überproduktion von Alginat, das eine Resistenz gegenüber der pulmonalen Klärung verursacht (Boucher et al. 1997). Weitere Beispiele für dieses Phänomen des loss-of-function findet man in *E. coli* in *mutS* Mutationen mit der Folge, dass DNA-Fehlpaarungen schlechter korrigiert werden, und in *cadA*-Mutationen, die die Aktivität von Endotoxinen fördern (Casalino et al. 2003; Day, Jr. et al. 2001; Maurelli et al. 1998).

Dagegen führen Mutationen in der Bindeuntereinheit der Typ 1-Fimbrien zu einer Funktionsvariation von *fimH*. Verschiedene Studien haben sowohl natürliche als auch durch Zufallsmutagenese künstlich erzeugte Mutanten identifiziert, die sich nur durch einzelne Aminosäuren unterscheiden und die ein distinktes Bindeverhalten gegenüber einer Vielfalt von Wirtszellen verursachen (Harris et al. 2001; Hung et al.

2002; Sokurenko et al. 2001a; Weissman et al. 2003). Während alle Varianten eine Affinität gegenüber trimannosehaltigen Rezeptorstrukturen aufweisen, können die Mutanten auch an monomannosehaltige Rezeptoren (Sokurenko et al. 1992; Sokurenko et al. 1994; Sokurenko et al. 1995; Sokurenko et al. 1997), wie sie auf den Epithelzellen in den Harnwegen vorkommen, und an nichtkohlehydratartige Strukturen wie CD48 (Baorto et al. 1997), Typ I und IV Kollagen (Pouttu et al. 1999), Laminin (Kukkonen et al. 1993) und Fibronektin (Schembri et al. 2000) binden. Mutationen innerhalb der FimH-Bindetasche werden nur selten gefunden, da diese ihre Funktionalität abschalten (Hung et al. 2002); statt dessen sind sie vor allem am unteren Teil der Lektindomäne aufzufinden, wo sie die Konformation der Loopstrukturen, die die Bindetasche bilden, beeinflussen (Schembri et al. 2000).

1.5. Relevante Resistenzen in *Escherichia coli*

Neben den Pathogenitätseigenschaften von Erregern spielen Resistenzen gegenüber Antibiotika eine zunehmende Rolle bei mikrobiellen Infektionen und damit auch in der Infektionsdiagnostik. Die zunehmende Prävalenz von resistenten Keimen in der Umwelt und in erster Linie in Krankenhäusern bzw. Intensivstationen erschweren die adäquate Therapie bei auftretenden Infektionen.

Dabei sind alle Arten von Antibiotika betroffen, deren Aktivität auf unterschiedliche Weise modifiziert oder abgeschwächt wird. Eine Gruppe von Resistenzmechanismen beinhaltet die enzymatische Inaktivierung des verabreichten Antibiotikums. So werden beispielsweise Betalaktamasen exprimiert, die Betalaktame durch Hydrolyse deaktivieren (Fisher et al. 2005); dagegen wird die Aktivität von Aminoglykosiden durch chemische Modifikation, die von einer Chloramphenicolacetyltransferase katalysiert wird, vermindert (Magnet und Blanchard 2005). Veränderungen der Angriffsstellen der Antibiotika stellen eine zweite Gruppe von Resistenzmechanismen da. Dazu gehören beispielsweise Modifikationen der 23rRNA oder ribosomaler Proteine, die zu einer Resistenz des Erregers gegenüber Makroliden oder Tetrazyklinen führt (Katz und Ashley 2005), ebenso wie Punktmutationen in der Gyrase, die die Bindung von Fluorchinolonen verhindern (Mitscher 2005). Eine weitere Strategie beinhaltet die Expression alternativer Zielstrukturen, die die gleiche Funktion wie das ursprüngliche durch das Antibiotikum inhibierte Molekül ausübt, aber für das Antibiotikum selbst nicht zugänglich ist. Das prominenteste Beispiel hierfür sind alternative Dihydrofolatreduktasen, die im Gegensatz zu dem in der genomischen DNA kodierten Enzym, das die essentielle Synthese von Tetrahydrofolat aus Dihydrofolat katalysiert, nicht durch Trimethoprim inhibiert werden (Kompis et al. 2005). Alternative Mechanismen beinhalten sowohl die Überexpression von Effluxmechanismen, durch die der Wirkstoff wiederum in das Zytoplasma gepumpt wird, als auch den Verlust von Porinstrukturen, durch die Wirkstoffe in das Zellinnere des Bakteriums gelangen. Oftmals sind solche Resistenzeigenschaften auf Resistenzplasmiden kodiert, die durch horizontalen Gentransfer ausgetauscht und durch Integronenelemente in das Genom eingefügt und wieder mobilisiert werden können. Diese Übersicht verdeutlicht, wie vielseitig die Mechanismen sind, die es Bakterien wie *E. coli* ermöglichen, Resistenzen auszubilden und eine Therapie zu erschweren. Die Konsequenz dieser Entwicklung ist eine abnehmende Empfindlichkeit vor allem von klinischen Isolaten gegenüber

Antibiotika, die wiederholt durch Studien wie beispielsweise der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (<http://www.p-e-g.org>) nachgewiesen werden konnte. In Abbildung 1-4 sind die in dieser Studie ermittelten Anteile an resistenten klinischen *E. coli* Isolaten gegenüber einer Vielzahl an Antibiotikaklassen in den Jahren 1990, 1995, 1998, 2001 und 2004 zusammengefasst. Darin wird vor allem die seit Jahren hohe

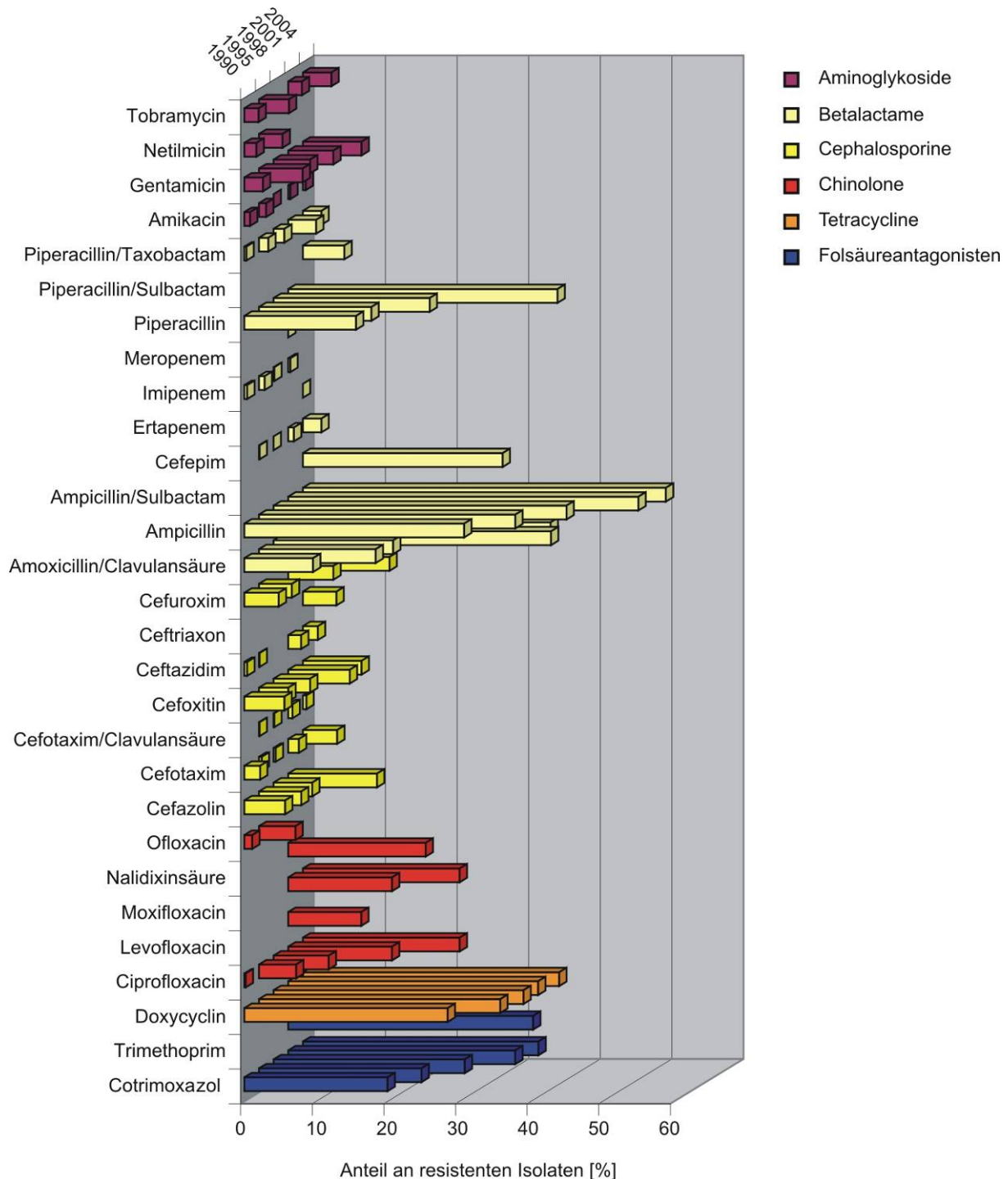


Abbildung 1-4: Resistenzen klinischer *E. coli*-Isolate gegenüber verschiedenen Klassen an Antibiotika in den Jahren 1990, 1995, 1998, 2001 und 2004 (Daten aus einer Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft; <http://www.p-e-g.org>)

Resistenz gegenüber Folatantagonisten wie Trimethoprim oder Sulfonamiden und Tetracyklinen sowie die Zunahme der Resistenz gegenüber Betalaktamen und Fluorchinolonen deutlich.

Fluorchinolone gehören neben den Betalaktamen zu den weltweit am häufigsten verabreichten Antibiotika überhaupt und werden oft als Medikament der ersten Wahl bei Harnwegsinfektionen verabreicht (Kallen et al. 2006). Im Verlauf der letzten Jahre haben Mikroorganismen verschiedene Resistenzmechanismen gegenüber dieser Klasse von Wirkstoffen entwickelt, so dass die Paul-Ehrlich-Gesellschaft 2004 einen Anteil an 21,9 % resistenten *E. coli* gegenüber Ciprofloxacin als Modellsubstrat detektieren konnte (Grenzwerte sensibel ≤ 1 mg/l; resistent > 2 mg/l). Damit gehört die Resistenz gegenüber Ciprofloxacin seit Jahren mit zu den am stärksten zunehmenden Resistenzen weltweit (Acar und Goldstein 1997).

Dabei gibt es eine Reihe von Mechanismen, die diese Resistenz auslösen; in erster Linie sind dies spezifische Mutationen innerhalb der QRDR der Zielgene *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*, die die Interaktion zwischen Antibiotikum und Zielprotein unterbinden (Fluit et al. 2001). Alternative Mechanismen beinhalten eine verminderte Aufnahme aufgrund einer veränderten Permeabilität der Membran und einer Überexpression der Effluxpumpen *acrR*, *marR* und anderen (Ruiz 2003). Neuerdings wurde außerdem eine genetische Variante eines aminoglykosidverändernden Enzyms in *E. coli*-Stämmen aus China entdeckt, das auch Fluorchinolone chemisch verändert. Durch N-Acetylierung des freien Aminostickstoffs in der Piperacyl-Seitenkette in Ciprofloxacin und Norfloxacin reduziert diese AAC(6')-Ib-Enzymvariante die Aktivität der Chinolone (Robicsek et al. 2006). Zusätzlich wurden Chinolonresistenzgene *qnrA* (Martinez-Martinez et al. 1998), *qnrB* (Jacoby et al. 2006) und *qnrS* (Hata et al. 2005) auf mobilen genetischen Elementen nachgewiesen. Deren Genprodukte interagieren mit der QRDR der Gyrase A mit der Konsequenz, dass die Bindung des Antibiotikums unterbunden wird. Zusammenfassend sind jedoch Mutationen der Positionen 83 und 87 in der Gyrase A die am häufigsten vorkommende Ursache (Heisig et al. 1993) und Grundvoraussetzung für die Wirksamkeit weiterer Mutationen in den anderen Zielgenen (Bagel et al. 1999) sowie für die Funktionalität der plasmidkodierten Schutzproteine (Mammeri et al. 2005). Arbeiten an isogenen Stämmen zeigten, dass durch diese zusätzlichen Resistenzmechanismen so genannte Hochresistenzen mit MHKs gegenüber Ciprofloxacin von teilweise > 256 mg/l ausgebildet werden (Heisig 1996). Die beiden oben genannten Mutationen in *gyrA* sind folglich der erste Schritt einer stufenförmigen Akkumulation von verschiedenen Resistenzmechanismen, die zu einer klinisch relevanten und bedenklich hohen Fluorchinolonresistenz führen.

1.6. Methoden zur Detektion pathogener Stämme

Ebenso vielseitig wie die unterschiedlichen Mechanismen, die zu einer Resistenz oder zur Pathogenität in *Escherichia coli* führen, sind die Ansätze in den letzten Jahren, diese auf der genetischen Ebene nachzuweisen. Für die Bestimmung des jeweiligen Serotyps eines Isolats, auf den bestimmte klinische Symptome zurückgeführt werden können, werden die Antigene auf der Zelloberfläche bestimmt. Dazu gehören vor allem das O-Antigen, eine an Lipopolysaccharide geknüpfte

Seitenkette, und das H-Antigen, ein Flagellinprotein; seltener wird auch das K-Antigen als Kapselstruktur untersucht. Als Goldstandard werden dazu zeit- und laboraufwändige Agglutinationsassays verwendet. Neuere Ansätze auf diesem Gebiet werden dagegen auf genetischer Basis durchgeführt. Durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus konnten 147 verschiedene O-Antigene (Coimbra et al. 2000) und 53 verschiedene H-Antigene (Prager et al. 2003) nachgewiesen werden. Ein erster Microarray zur Detektion von verschiedenen O-Antigenen mit der Ziel der Identifizierung von 15 *Shigella*- und *Escherichia coli*-Serotypen wurde von Li und Mitarbeitern entwickelt (Li et al. 2006). In einer neuen Studie konnten Ballmer und Mitarbeiter einen weiteren Microarray entwickeln, um simultan die wichtigsten O- und H-Antigene nachzuweisen (Ballmer et al. 2007).

Ein anderer Ansatz liefert die Bestimmung der phylogenetischen Gruppe, die auf die *Escherichia coli*-Referenzsammlung (ECOR-Sammlung) zurückgeht. Diese 72 natürlich vorkommenden Isolate wurden von Ochman und Selander als repräsentative Stämme der genetischen Vielfalt von *E. coli* eingeführt (Ochman und Selander 1984). Diese Varianten werden in die folgenden Gruppen eingeteilt: A, B1, B2, D und E (Abbildung 1-5), wobei in Gruppe A vor allem kommensalische Stämme zu finden sind; die pathogenen Varianten findet man in erster Linie in Gruppe B2 und mit Abstrichen in Gruppe D (Picard et al. 1999). Die Einteilung erfolgte dabei lange Zeit mit Multilokusenzymelektrophorese (MLEE) (Selander et al. 1986) und heutzutage standardmäßig mit Multilokussequenztypisierung (MLST); dabei müssen sieben Strukturgene aus der genomischen DNA (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* und *recA*) komplett sequenziert werden; die allelischen Varianten ermöglichen im Anschluss eine Einteilung in die ECOR-Gruppe (Wirth et al. 2006). In der MLST-Datenbank (<http://web.mpiib-berlin.mpg.de/mlst/>) sind bereits 1502 Einträge aufgeführt (Stand: September 2007).

Eine deutlich schnellere Methode zur routinemäßigen Untersuchung ist der Nachweis von drei genomischen DNA-Fragmenten *chuA*, *yjaA* und einem nicht näher

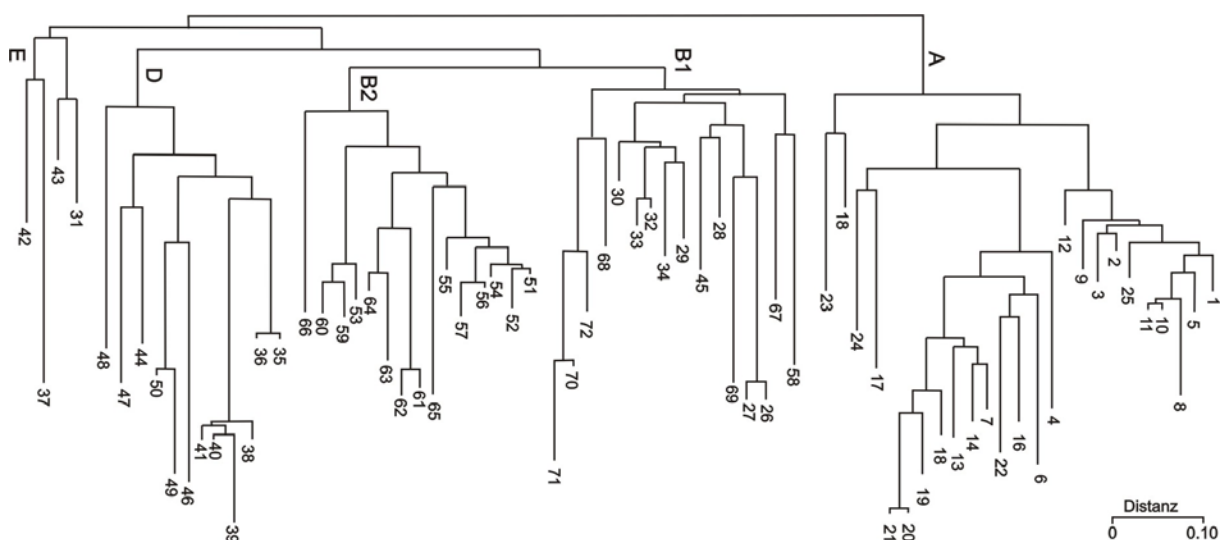


Abbildung 1-5: Alignment der 72 ECOR-Stämme mit der gültigen Einteilung in die phylogenetischen Gruppen A, B1, B2, D und E (Herzer et al. 1990)

bezeichneten DNA-Fragment TspE4.C2 (Clermont et al. 2000) durch PCR, der eine Einteilung in die Gruppen A, B1, B2 und D ermöglicht. Weiterhin wurde ein Assay mittels Ribotypisierung (Clermont et al. 2001) zur Erfassung der phylogenetischen Gruppe entwickelt.

Als Kernstück der Pathotypisierung von *E. coli* dient jedoch nach wie vor der Nachweis von Virulenzgenen, wozu in verschiedenen Studien eine simultane Amplifizierung dieser Faktoren durch Multiplex-PCR mit virulenzgenspezifischen Primern durchgeführt wurde. Durch einfache Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Virulenzfaktoren nachgewiesen. In einer frühen Studie konnten Yamamoto und Mitarbeiter in einem Assay sechs prominente Virulenzgene (*pap*, *hly*, *aer*, *cnf1*, *sfa* und *afaI*) in der genomischen DNA von *E. coli* nachweisen und damit 194 Isolate untersuchen (Yamamoto et al. 1995). Mit der Entdeckung neuer Pathogenitätseigenschaften wurde dieser Assay weiterentwickelt. So wurde von Johnson und Stell schließlich ein Assay etabliert, um insgesamt 29 Virulenzgene in extraintestinal pathogenen *E. coli* mit einer 100 %-igen Spezifität und 97,1 %-igen Sensitivität zu detektieren (Johnson und Stell 2000).

Die Entwicklung neuer Assays geht in Richtung Microarraytechnologie. Zahlreiche Arbeiten haben in den letzten Jahren den Nachweis von Virulenzfaktoren durch genspezifische Sonden auf so genannten Pathoarrays erbracht. Bereits 1991 konnten in einer Studie mit der Dot Blot-Technologie fünf Virulenzgene nachgewiesen werden (Ott et al. 1991). Konventionelle Microarrays (Abbildung 1-6) zur Pathotypisierung wurden erstmals von Chizhikov und Mitarbeitern verwendet, um sechs Virulenzgene nachzuweisen (Chizhikov et al. 2001). Dabei wurden kurze Oligonukleotide gespottet und mit den PCR-Produkten einer Multiplex-PCR hybridisiert. In weiteren Entwicklungen wurden bereits 28 Virulenzgene bzw. 105 Gene, die mit Virulenz in *E. coli* assoziiert wurden, mittels Microarraytechnologie detektiert. Dabei wurden die jeweiligen PCR-Produkte des entsprechenden Virulenzgens als Sonden auf dem Microarray verwendet. Als Ziel-DNA wurden unspezifisch vervielfältigte, fluoreszenzmarkierte genomische DNA (van Ijperen et al. 2002) bzw. die PCR-Produkte einer Multiplex PCR verwendet (Bekal et al. 2003). In einer weiteren systematischen Untersuchung wurden 212 für ORFs der Pathogenitätsinseln des UPEC-Stammes 536 spezifische Sonden, 100 weitere

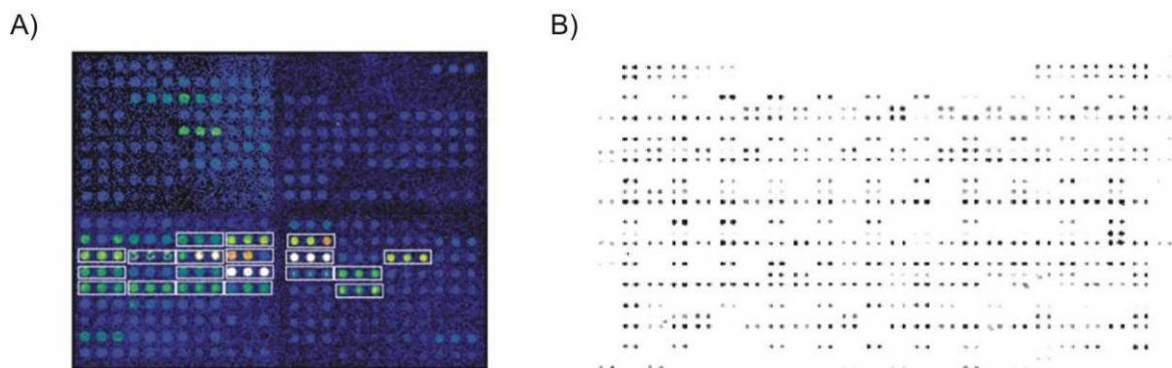


Abbildung 1-6: Darstellung von zwei so genannten Pathoarrays zur Detektion von Virulenzgenen; die Sonden wurden auf A) Glasoberflächen (Bekal et al. 2003) oder B) Nylonmembranen (Dobrindt et al. 2003) gedruckt.

Sonden, die gegen ExPEC-spezifische Gene gerichtet sind, sowie 95 spezifische Sonden für intestinal pathogene *E. coli* und *Shigella* auf Nylonmembranen gedruckt (Dobrindt et al. 2003).

Zu den neueren Anwendungen dieser Pathoarrays gehören die Untersuchung des mit Meningitis assoziierten Serotyps K1 auf spezifische Virulenzfaktoren (Korczak et al. 2005) und die Entwicklung eines Microarrays zum Nachweis von Virulenzgenen in enteroaggregativen *E. coli* Stämmen (Jenkins et al. 2005).

Die simultane Detektion von Pathogenitäts- und Resistenzeigenschaften ist neben der Speziesidentifizierung ein Schlüsselement in der Infektionsdiagnostik. So wurden bereits einige Microarrays entwickelt, um die Anwesenheit wichtiger Virulenz- und Resistenzgene in *Escherichia coli* nachzuweisen (Bruant et al. 2006; Chen et al. 2005; Cleven et al. 2006; Hamelin et al. 2006). Der bloße Nachweis eines Gens ist bei manchen Fragestellungen wie der Genotypisierung jedoch nicht ausreichend, weil dadurch keine einzelnen Mutationen in einer Sequenz nachgewiesen werden können. Während Mutationen in *fimH* bislang lediglich durch Sequenzierung identifiziert wurden (Hommais et al. 2003), konnte eine ganze Reihe an Methoden in verschiedenen Studien zur Detektion von Mutationen in *gyrA* erfolgreich angewendet werden. Dazu gehören RFLP (Ozeki et al. 1997), DHPLC (Randall et al. 2005), Real-time PCR (Lapierre et al. 2003), Pyrosequenzierung (Hopkins et al. 2007) und Microarrays (Booth et al. 2003; Zhou et al. 2004).

1.7. Methoden zur Genotypisierung

Der Goldstandard zum Nachweis mehrerer einzelner Mutationen vor allem in einer kleinen Region eines DNA-Abschnitts ist nach vor die Sequenzierung nach Sanger, dessen Methode auf dem Einsatz von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden beruht, die zum Kettenabbruch führen (Sanger et al. 1977); dieses Verfahren ist jedoch vergleichsweise zeitaufwändig. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren zahlreiche Methoden entwickelt, um einzelne Polymorphismen schneller identifizieren zu können.

Bei den Methoden, die sich die physikalischen Eigenschaften der DNA zu Nutze machen, wird das auf SNPs zu untersuchende DNA-Fragment mit der bekannten Wildtypvariante als Referenz gemischt und durch hohe Temperaturen aufgeschmolzen. Die Bildung von Heteroduplexen aus beiden Allelen kann im Anschluss durch langsames Abkühlen der Probe vollzogen werden; die Detektion eventueller Fehlpaarungen und damit der Mutation wurde bislang mit Temperaturgradientengelelektrophorese oder denaturierender HPLC durchgeführt (Costabile et al. 2006).

Zu den enzymbasierten Methoden gehört traditionell die Untersuchung bestimmter Sequenzen durch Behandlung mit Restriktionsenzymen (RFLP); nur wenn eine bestimmte Mutation vorhanden ist, kann das Enzym das Fragment verdauen. Ebenso werden Nukleasen verwendet, die spezifisch Fehlpaarungen in DNA-Duplexen erkennen und den Doppelstrang an dieser Stelle schneiden (Oleykowski et

al. 1998; Qiu et al. 2004). In beiden Fällen können die Ergebnisse der Reaktion durch Gelelektrophorese ermittelt werden. Eine relativ neue Entwicklung ist die Pyrosequenzierung (Ronaghi 2001), bei der freies Pyrophosphat detektiert wird, das bei der DNA-Synthese entsteht. Weitere neue Anwendungen, von denen viele auf das Microarrayformat erfolgreich übertragen wurden, verwenden in einem ersten Schritt eine allelspezifische Hybridisierung; die Detektion erfolgt oftmals durch einen enzymatischen Schritt. Eine vergleichsweise einfache Methode ist die allelspezifische Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch den Einsatz von allelspezifischen Primern, die sich durch ihr Nukleotid am 3'-Ende unterscheiden. Nur bei den vollständig komplementären Primerpaaren kann durch PCR die DNA amplifiziert werden (Strerath und Marx 2005). Einen ähnlichen Ansatz liefert die allelspezifische Primerelongation, bei der fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in der DNA-Synthese eingesetzt werden, die sehr leicht detektiert werden können. Im Invader-Assay wird indessen die Flap-Endonuklease I eingesetzt, die selektiv perfekt gepaarte Komplexe aus Zielsequenz und Signalsequenz spaltet (Mein et al. 2000). Dagegen wird die 5'-3'-Exonukleaseaktivität von DNA-Polymerasen im TaqMan-Assay z.B. bei der Real-time-PCR genutzt, durch die nur das perfekt gepaarte Hybrid aus TaqMan-Sonde und Wildtypallel gespalten wird und ein Fluorophor frei gesetzt wird, das im Anschluss detektiert werden kann (Latif et al. 2001). Schließlich kann auch der Einsatz von Ligasen verwendet werden, durch deren Aktivität die Enden von allelspezifischen Padlock-Sonden ligiert werden. In einem zweiten Schritt werden nicht perfekt gepaarte DNA-Komplexe, in denen der SNP vorliegt, durch Exonukleasen verdaut (Baner et al. 2003).

Neben diesen enzymbasierten Methoden zur SNP-Detektion wird routinemäßig die allelspezifische Hybridisierung eingesetzt. Dabei werden kurze allelspezifische Oligonukleotide verwendet, die bei stringenten Bedingungen nur an eine perfekt komplementäre DNA-Sequenz binden. Dabei wird die kritische Base zur möglichst eindeutigen Diskriminierung zwischen den allelspezifischen Varianten in die Mitte der Sonde gelegt (Letowski et al. 2004). Um eine möglichst hohe Effizienz bei der Hybridisierung auf der Oberfläche eines Microarrays zu erreichen, werden die Sonden zusätzlich um einen Abstandshalter verlängert sowie die Ziel-DNA unspezifisch fragmentiert (Southern et al. 1999). Neben standardmäßig eingesetzten DNA-Sonden wurden in verschiedenen Studien auch PNA- (Gaylord et al. 2005) und LNA-Sonden (Mouritzen et al. 2003) eingesetzt, die sich durch eine erhöhte Spezifität auszeichnen. Daneben gibt es weitere Variationen bei der Entwicklung der Sonden wie Molecular Beacons (Tyagi et al. 1998), Zip-Code-Sonden (Gerry et al. 1999) oder Komplexe, die auf dem Prinzip der Holliday junctions beruhen (Buck et al. 2007; Yang et al. 2003). Diese Methoden benötigen eine Markierung in Form von Fluoreszenzfarbstoffen, Quantum Dots, magnetischen Beads, Komplexen aus Biotin-Streptavidin, usw. Um diesen häufig kostenintensiven Schritt zu umgehen, werden in letzter Zeit vermehrt DNA-Sensoren mit verschiedenen Transduktionprinzipien entwickelt, die prinzipiell eine Detektion von DNA-Doppelsträngen und damit auch von einzelnen Fehlpaarungen über markierungsfreie Systeme erlauben. Dazu gehören Fluorimetrie (Soper et al. 2005), piezoelektrische Sensoren auf Basis von Quarzkristallen (Dell'Atti et al. 2006) und Oberflächenplasmonresonanz (Sato et al. 2003). Ein interessanter Ansatz beinhaltet den Einsatz des Proteins MutS nach der Hybridisierung, das spezifisch an DNA-Fehlpaarungen bindet und über Oberflächenplasmonresonanz (Behrendorf et al. 2002) nachgewiesen werden kann.

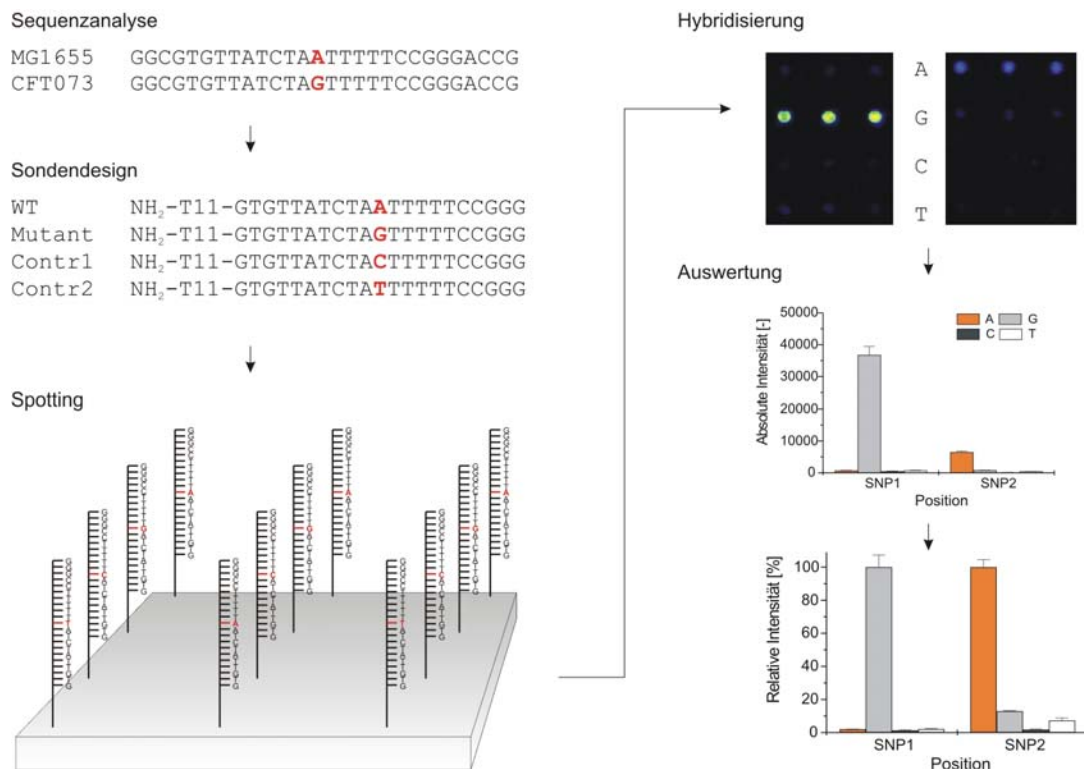


Abbildung 1-7: Übersicht über den Ablauf einer allelspezifischen Hybridisierung. Die Sonden werden auf Oberflächen gespotet und mit markierter Ziel-DNA inkubiert; im Anschluss werden die (Fluoreszenz-) Signale ausgelesen, so dass die entsprechenden Nukleotide an den relevanten Positionen identifiziert werden können.

Elektrochemische Assays scheinen aufgrund ihrer geringen Kosten, der Portabilität und ihres geringem Energieverbrauchs eine vielversprechende Alternative besonders für die POC-Anwendung zu sein. Die Durchführbarkeit solcher Ansätze wurde vielfach nachgewiesen (Drummond et al. 2003; Wang et al. 2004), wobei die elektrochemischen Messungen auf Coulometrie (Boon et al. 2000), Voltametrie (Inouye et al. 2005) und Impedanzspektroskopie beruhen (Ito et al. 2007; Long et al. 2004; Patolsky et al. 2001).

1.8. Zielstellung dieser Arbeit

Der zentrale Gegenstand dieser Arbeit ist die gleichzeitige Detektion von pathoadaptiven Mutationen in *fimH* und den für eine potentielle Resistenz relevanten Mutationen in *gyrA* über allelspezifische Hybridisierung auf einem DNA-Microarray. Dieser sollte verwendet werden, um das Pathogenitätspotential und eine mögliche Fluorchinolone-resistenz in *E. coli*-Isolaten abzuschätzen.

In dieser Arbeit sollte in einem ersten Schritt ein *fimH*-Microarray entwickelt und durch Validierung mit Referenzstämmen etabliert werden, um die häufigsten Mutationen in *fimH* identifizieren zu können. Dieser Array sollte schließlich verwendet werden, um die 72 Stämme der ECOR-Sammlung sowie 50 weitere Blindproben und sechs klinische Isolate, die eine phänotypische Fluorchinolone-resistenz aufgewiesen

hatten, zu untersuchen. Anhand dieser Ergebnisse sollten folgende Zusammenhänge diskutiert werden:

- Gibt es bestimmte Kombinationen an *fimH*-Mutationen, die nur zusammen auftreten?
- Gibt es eine Beziehung zwischen *fimH*-Mutationen und klinischen Symptomen beim Wirt des entsprechenden *E. coli*-Isolates?
- Gibt es eine Beziehung zwischen diesen pathoadaptiven Mutationen und der phylogenetischen Abstammung des jeweiligen Isolats? Spiegeln sich die über den Microarray identifizierten *fimH*-Mutationen in einem Stammbaum wider, der durch Sequenzierung ermittelt werden sollte?
- Wie groß ist die Abdeckung des Arrays hinsichtlich neuer Mutationen, die eventuell durch Sequenzierung der *fimH*-Varianten der Blindproben identifiziert wurden?

In einem zweiten Schritt sollte der bereits etablierte *gyrA*-Microarray (Yu et al. 2004; Yu et al. 2007) anhand neuer Veröffentlichungen und publizierter Sequenzen überarbeitet, mit den Referenzstämmen validiert und schließlich in den *fimH*-Microarray integriert werden. Abschließend sollte dieser integrierte Microarray verwendet werden, um alle Blindproben simultan auf Mutationen in *fimH* und *gyrA* zu untersuchen. Drei Aspekte sollten dabei näher untersucht werden:

- Wie viele der Blindproben weisen eine potentielle Resistenz auf? Gibt es dabei einen Zusammenhang zwischen Fluorchinolonresistenz und klinischen Symptomen?
- Kann die phänotypische Resistenz der klinischen Isolate auf *gyrA*-Mutationen zurückgeführt werden?
- Sind in den Stämmen der ECOR-Sammlung, die 1982 und damit bereits vor der Einführung von Fluorchinolonen als Antibiotikum etabliert wurde, *gyrA*-Mutationen auffindbar, die zu einer Resistenz führen können?

Zusätzlich sollten grundlegende Fragestellungen der Technologie untersucht werden:

- Welche Einfluss haben stille Mutationen und die Einbauraten von Fluoreszenzfarbstoffen auf die Hybridisierung zwischen Sonde und Ziel-DNA?
- Kann der bestehende Assay hinsichtlich einer möglichst schnellen Durchführung optimiert werden?
- Wie groß ist der Einfluss von Kreuzhybridisierungen bei der simultanen Hybridisierung von zwei Zielgenen auf dem integrierten Microarray?
- Wo liegen die Grenzen des Assays bezüglich der Sensitivität des Systems?
- In welchem Verhältnis können Mischpopulationen von *E. coli* auf dem Microarray aufgelöst werden?
- Können inhomogene Spots, die eine unbefriedigende Morphologie aufweisen, sinnvoll erfasst werden und von der Auswertung durch Filterung ausgeschlossen werden?
- Kann die allelspezifische Hybridisierung durch den Einsatz einer mismatchspezifischen Endonuklease verbessert werden?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Hersteller	Bezeichnung	Gerät
PE Applied Biosystems (Weiterstadt)	Scanner für Microarrays	Scan Array Express
Agilent (Böblingen)	Lab-on-a-chip Elektrophorese	Agilent Bioanalyzer 2100
Applied Biosystems (Darmstadt)	DNA-Sequenziergerät	ABI Prism 377-DNA-Sequencer
Biorobotics (Cambridge, UK)	Spotter	Microgrid II Microarrayer
Eppendorf (Hamburg)	Zentrifuge Thermomixer Slideadapter PCR-Cycler	5417R, 5810R und MiniSpin Thermomixer Comfort Thermomixer Slide Adapter MasterCycler ep Gradient MasterCycler ep Gradient S
Fujifilm (Düsseldorf)	Geldokumentationssystem	Image Reader Las-1000 Plus
Memmert (Schwabach)	Trocknungskompartiment	Universal Oven (Model U)
NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)	Spektrophotometer	ND-1000 Spectrophotometer
WTW (Weinheim, Germany)	pH-Meter	pH500

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Hersteller	Bezeichnung
Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein)	Agarose, 1kb DNA Ladder
Fermentas (York, UK)	10x <i>Taq</i> Buffer mit KCl and 15mM MgCl ₂
Metabion (Martinsried)	Oligonukleotide
Promega (Mannheim)	DNase I
Applied Biosystems (Darmstadt)	RT-PCR Grade Water, Big-dye Terminator Cycle Sequencing Kit
Merck (Darmstadt)	LiChrosolv (HPLC Wasser)
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	Bromphenolblau, CaCl ₂ , Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylenglykol, HCl, KCl, MgSO ₄ , Na ₃ Citrat·2H ₂ O, NaCl, Na ₂ EDTA, Na ₂ SO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , NaOH, Trizma base, TritonX100, dNTPs, EGTA
Roth (Karlsruhe)	Natriumdodecylsulfat (SDS), ≥ 99%
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	FluoroLink Cy3-dCTP
Agilent (Böblingen)	DNA 1000 LabChip Kit
Eppendorf (Hamburg)	<i>Taq</i> DNA Polymerase, <i>Taq</i> Puffer
Transgenomic (Elancourt, Frankreich)	SURVEYOR Mutation Detection Kits for Standard Gel Electrophoresis
Qiagen (Hilden)	QIAquick PCR Purification Kit

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Hersteller	Bezeichnung
Eppendorf (Hamburg)	CreativeChip® Oligo Slides
Abgene Limited (Epsom, UK)	Gene Frame (25 µl und 65µl), Coverslips
Greiner Bio One (Frickenhausen)	Microtiterplatten (384 Well, Polypropylen, V-Boden)

2.1.4. Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Spottingpuffer für CreativeChip Oligo Slides	160 mM Na ₂ SO ₄ 130 mM Na ₂ HPO ₄
Spüllösung 1 für CreativeChip Oligo Slides	0,1 % (v/v) TritonX100
Spüllösung 2 für CreativeChip Oligo Slides	0,5 µl konzentrierte HCl / ml ddH ₂ O
Spüllösung 3 für CreativeChip Oligo Slides	100 mM KCl
Blocklösung für CreativeChip Oligo Slides	25 % (v/v) Ethylenglykol 0,5 µl konzentrierte HCl / ml ddH ₂ O
10x DNase Puffer	400 mM Tris-HCl (pH 8) 100 mM MgSO ₄ 10 mM CaCl ₂
20x SSPE	2,98 M NaCl 200 mM Phosphatpuffer 20 mM EDTA pH 7,4
20x SSC	3 M NaCl 300 mM Na ₃ Citrat-2 H ₂ O pH 7,0
Waschlösung 1 für CreativeChip Oligo Slides	2x SSC 0,2 % SDS
Waschlösung 2 für CreativeChip Oligo Slides	2x SSC
Waschlösung 3 für CreativeChip Oligo Slides	0,2x SSC

2.1.5. Software

Hersteller bzw. Link	Bezeichnung
Perkin Elmer (Weiterstadt)	ScanArray Express (Version 3.0)
www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html	BioEdit (Version 7.0.)
Agilent (Böblingen)	Bio Sizing (Version A.02.11)
Microsoft (Redmond, USA)	MS Excel (2003)
DNASStar (Madison, USA)	SeqMan™ II (Version 5.0)
PREMIER Biosoft International (Palo Alto, Canada)	Array Designer (Version 3.0)
Biorobotics (Cambridge, UK)	TAS Application Suite (Version 2.6)
http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/	OligoAnalyzer
Microcal Software (Northampton, USA)	Origin 5.0
Invitrogen (Karlsruhe)	ICS-501 Image Capture
ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/	ClustalX (Version 1.81)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST	nucleotide - nucleotide BLAST (Blastn) protein - protein BLAST (Blastp)

2.1.6. Stämme und Isolate

Die Isolierung der genomischen DNA der *E. coli*-Referenzstämme (Tabelle 2-1), der Stämme und Isolate (Tabelle 2-2), die als Blindproben untersucht wurden, sowie der ECOR-Stämme (Tabelle 2-3) wurde am Institut für Molekulare Infektionsbiologie (IMIB, Uni Würzburg), am Institut für Technische Biochemie (ITB, Uni Stuttgart), am Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT, Uni Stuttgart) und am Robert-Bosch-Krankenhaus (RBK, Stuttgart) aus Reinkulturen durchgeführt.

Tabelle 2-1: Referenzstämme

Bezeichnung	Phylogenetische Gruppe	Beschreibung	Serotyp	Bezugsquelle
W3110	A	Laborstamm	OR:H48:K-	IBVT, Stuttgart
MG1655	A	Laborstamm	OR:H48:K-	IMIB, Würzburg
EDL933	A	EHEC	O157:H7	IMIB, Würzburg
CFT073	B2	ExPEC	O6:H1:K?	IMIB, Würzburg
U15822 (= IMI921)	B1	Chronische HWI	O153:H31	IMIB, Würzburg
U33041 (= IMI929)	D	Chronische HWI	O2:H42	IMIB, Würzburg
BEN79	B2	ExPEC	nd	IMIB, Würzburg
BEN374	B2	ExPEC	nd	IMIB, Würzburg
BEN2908	B2	ExPEC	nd	IMIB, Würzburg
536	B2	ExPEC	O6:K15:H31	IMIB, Würzburg
IHE3034	B2	MNEC	O18:K1:H7	IMIB, Würzburg

n.d. = keine Bezeichnung

Tabelle 2-2: Blindproben

Bezeichnung	Phylogenetische Gruppe	Beschreibung	Serotyp	Bezugsquelle
AC/1	B1	APEC	nd	IMIB
ABU12	B2	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU16	B2	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU20	B2	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU21	B1	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU27	B2	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU37	B2	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU38	B1	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU57	A	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU62	B1	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU63	B2	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU64	B2	asymptomatisch	nd	IMIB
ABU83972	B2	asymptomatisch	nd	IMIB
U12587	A	chronische HWI	O101:H-	IMIB
U25216	A	chronische HWI	O101:H-	IMIB
B19062	D	chronische HWI	O102:H6	IMIB
B04058	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
B10490	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U12633	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U12740	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U15156	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U15451	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U15672	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U15762	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U17709	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U19010	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U19264	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U19310	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U23741	B1	chronische HWI	O153:H31	IMIB
U24421	D	chronische HWI	O2:H42	IMIB
S48	D	ExPEC	O1:K1	IMIB
S55	A	ExPEC	O16:K1	IMIB
S44	B2	ExPEC	O18:K1	IMIB
S49	B2	ExPEC	O18:K1	IMIB
S6	B2	ExPEC	O18:K1	IMIB
S39	D	ExPEC	O7:K1	IMIB
S87	B2	ExPEC	Ond:K1	IMIB
764	B2	Fäkalisolat	O18:K1:H7	IMIB
A152	B2	Fäkalisolat	O7:K1:H5	IMIB
A173	D	Fäkalisolat	O18:K5:H5	IMIB
RS218	B2	MNEC	O18:K1:H-	IMIB
P42	B2	Pyeloniphritis	O1:K1:H7	IMIB

Bezeichnung	Phylogenetische Gruppe	Beschreibung	Serotyp	Bezugsquelle
10413/93	B2	Sepsis	nd	IMIB
C25	A	Sepsis	nd	IMIB
39350	B2	HWI	O25	IMIB
177115	B2	HWI	O25	IMIB
F11	B2	HWI	nd	IMIB
RZ422	B2	HWI	O6:K14:H-	IMIB
RZ479	B2	HWI	O6:K14:H	IMIB
RZ505	B2	HWI	O6:K+:H31	IMIB
RZ532	B2	HWI	O6:K+:H-	IMIB
DH5 α	nd	Laborstamm	nd	ITB
UR888	nd	chinolonresistent	nd	RBK
UR947	nd	chinolonresistent	nd	RBK
UR1013	nd	chinolonresistent	nd	RBK
UR1365	nd	chinolonresistent	nd	RBK
UR146	nd	chinolonresistent	nd	RBK
UR1520	nd	chinolonresistent	nd	RBK

n.d. = keine Bezeichnung

Tabelle 2-3: ECOR-Isolate

Bezeichnung	Phylog. Gruppe	Wirt	Ursprung	Bezugsquelle
ECOR1	A	Human (F)	Iowa, USA	IMIB
ECOR2	A	Human (M)	New York, USA	IMIB
ECOR3	A	Hund	Massachusetts, USA	IMIB
ECOR4	A	Human (F)	Iowa, USA	IMIB
ECOR5	A	Human (F)	Iowa, USA	IMIB
ECOR6	A	Human (M)	Iowa, USA	IMIB
ECOR7	A	Orang-Utan	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR8	A	Human (F)	Iowa, USA	IMIB
ECOR9	A	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR10	A	Human (F)	New York	IMIB
ECOR11	A	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR12	A	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR13	A	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR14	A	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR15	A	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR16	A	Leopard	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR17	A	Schwein	Indonesien	IMIB
ECOR18	A	Menschenaffe	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR19	A	Menschenaffe	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR20	A	Ochse	Bali	IMIB
ECOR21	A	Ochse	Bali	IMIB
ECOR22	A	Ochse	Bali	IMIB
ECOR23	A	Elefant	Washington (Zoo), USA	IMIB

Material und Methoden

Bezeichnung	Phylog. Gruppe	Wirt	Ursprung	Bezugsquelle
ECOR24	A	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR25	A	Hund	New York, USA	IMIB
ECOR26	B1	Kind	Massachusetts, USA	IMIB
ECOR27	B1	Giraffe	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR28	B1	Human (F)	Iowa, USA	IMIB
ECOR29	B1	Känguruhratte	Nevada, USA	IMIB
ECOR30	B1	Bison	Alberta, USA	IMIB
ECOR31	E	Leopard	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR32	B1	Giraffe	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR33	B1	Schaf	Kalifornien, USA	IMIB
ECOR34	B1	Hund	Massachusetts, USA	IMIB
ECOR35	D	Human (M)	Iowa, USA	IMIB
ECOR36	D	Human (F)	Iowa, USA	IMIB
ECOR37	E	Pinselflächen	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR38	D	Human (F)	Iowa, USA	IMIB
ECOR39	D	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR40	D	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR41	D	Human (M)	Tonga	IMIB
ECOR42	E	Human (M)	Massachusetts, USA	IMIB
ECOR43	E	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR44	D	Puma	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR45	B1	Schwein	Indonesien	IMIB
ECOR46	D	Menschenaffe	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR47	D	Schaf	Neuguinea	IMIB
ECOR48	D	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR49	D	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR50	D	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR51	B2	Kind	Massachusetts, USA	IMIB
ECOR52	B2	Orang-Utan	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR53	B2	Human (F)	Iowa, USA	IMIB
ECOR54	B2	Human	Iowa, USA	IMIB
ECOR55	B2	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR56	B2	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR57	B2	Gorilla	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR58	B1	Löwe	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR59	B2	Human (M)	Massachusetts, USA	IMIB
ECOR60	B2	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR61	B2	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR62	B2	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR63	B2	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR64	B2	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR65	B2	Menschenaffe	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR66	B2	Menschenaffe	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR67	B1	Ziege	Indonesien	IMIB
ECOR68	B1	Giraffe	Washington (Zoo), USA	IMIB

Bezeichnung	Phylog. Gruppe	Wirt	Ursprung	Bezugsquelle
ECOR69	B1	Menschenaffe	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR70	B1	Gorilla	Washington (Zoo), USA	IMIB
ECOR71	B1	Human (F)	Schweden	IMIB
ECOR72	B1	Human (F)	Schweden	IMIB

2.2. Sequenzanalyse und Sondendesign

Durch eine Homologiesuche mit Hilfe der Referenzsequenz von *E. coli* MG1655 *fimH* / *gyrA* bzw. FimH / GyrA (Accession Nr. U00096) wurden in Blastn Nukleotid- bzw. in Blastp Aminosäuresequenzen extrahiert, die über ein Sequenzalignment in BioEdit und ClustalX mit der jeweiligen Referenzsequenz auf Polymorphismen bzw. Mutationen untersucht wurden. Zusätzlich wurden für die Entwicklung der allelspezifischen Sonden des *fimH*-Microarrays Mutationen aus verschiedenen Publikationen sowie Nukleotidsequenzen aus eigenen Sequenzierungen berücksichtigt.

Die thermodynamischen Eigenschaften aller Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Onlinetools OligoAnalyzer bestimmt. Für die Entwicklung der Primerpaare für die Amplifizierung von *gyrA* und *fimH* (Tabelle 2-4) wurden hochkonservierte Bereiche der beiden Gene gewählt. Dabei wurden diese so entwickelt, dass deren Schmelztemperaturen etwa 49 °C betragen. Für die Entwicklung der allelspezifischen Sonden (Tabelle 2-4) wurde die Software Array Designer 3.0 verwendet. Dabei wurde jeweils eine komplementäre Sonde für die Wildtyp- und die Mutantensequenz entwickelt, wobei die für die Hybridisierung kritische Base in die Mitte der Sonde gelegt wurde. Zusätzlich wurden für jeden Sondensatz zwei weitere Sonden mit den beiden übrigen Nukleotiden als zentralen kritischen Basen als Kontrolle verwendet. Alle Sonden wurden in Sense-Richtung entworfen. Zur Verifizierung der thermodynamischen Eigenschaften der Oligonukleotide wurde wiederum das Onlinetool OligoAnalyzer verwendet. Alle Sonden wurden so gewählt, dass sie möglichst eine Schmelztemperatur von $T_m = 53$ °C, sowie freie Bindungsenergien für Haarnadelstrukturen von $\Delta G_{\text{Hairpin}} > -1$ kcal/mol und für Dimerstrukturen von $\Delta G_{\text{Dimer}} > -6$ kcal/mol aufweisen sollten. Zusätzlich wurden die Oligonukleotide um einen Spacer aus elf Thymidinbasen und einer C6-Aminomodifikation am 5'-Ende erweitert.

Um den Ablauf des Experiments kontrollieren zu können, wurden eine mit Cy3 fluoreszenzmarkierte Spottingkontrolle sowie jeweils eine Sonde als negative und positive Hybridisierungskontrolle verwendet. Dabei handelt es sich um Sequenzen aus dem Genom von *Arabidopsis thaliana*, die eine Kreuzhybridisierung mit der DNA aus *E. coli* ausschließen. Zusätzlich wurde für den *fimH*- und den *gyrA*-Microarray jeweils eine Sonde als Prozesskontrolle verwendet, wobei es sich um eine Sondensequenz handelt, die komplementär zu einer hochkonservierten Region des jeweiligen Zielgens ist.

2.3. Amplifizierung der Ziel-DNA

Zur Amplifizierung des jeweiligen Zielgens wurde eine Standard-PCR in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Dabei wurden 50 ng genomische DNA (entspricht in etwa 10^7 *E. coli*-Genomäquivalenten) mit jeweils 0,4 µM der beiden Primer (Tabelle 2-4), jeweils 0,1 mM aller Didesoynukleotide, 1x *Taq*-Puffer und 2.5 U der *Taq*-Polymerase gemischt. Bei einer Markierungs-PCR wurde ein 3:2 Verhältnis von dCTP zu Cy3-dCTP verwendet. Zur gleichzeitigen Amplifizierung beider Zielgene wurden die *fimH*- und *gyrA*-Primer in den Konzentrationen 0,5 µM bzw. 0,2 µM eingesetzt. Die Amplifizierung wurde in einem Mastercycler ep gradient bzw. Mastercycler ep gradient S mit folgendem Standardprogramm durchgeführt: 2 min bei 94 °C (initiale Denaturierung); 30 Zyklen à 30 s bei 94 °C (Denaturierung), 30 s bei 55 °C (Primeranlagerung) und 60 s bei 72 °C (Verlängerung der Primer); 4 min bei 72 °C (abschließende Verlängerung). Dies resultiert in einer Gesamtdauer von 88 min bzw. 74 min.

Die Amplifizierung der Zielgene wurde durch Analyse der PCR-Produkte auf einem 1,5 %-igen Agarosegel (40 min bei 100 V) bestätigt. Nach der anschließenden Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese in 30 µl ddH₂O eluiert und die Massenkonzentration der DNA β_{DNA} [ng/µl] sowie die Molarität des eingebauten Cy3-Farbstoffs c_{Cy3} [pmol/µl] durch Messung der Absorption der Probe bei 260 nm bzw. 550 nm im Spektrophotometer gemessen. So konnte die Einbaurrate E des Fluoreszenzfarbstoffs mit

$$\begin{aligned} E = n_{\text{NT}} / n_{\text{Cy3}} &= (m_{\text{DNA}} / M_{\text{nt}}) / (c_{\text{Cy3}} \cdot V_{\text{Lsg}}) \\ &= (\beta_{\text{DNA}} / M_{\text{nt}}) / c_{\text{Cy3}} \end{aligned} \quad (1)$$

und dem gemittelten Molekulargewichts eines Nukleotids M_{nt} von 330 g/mol berechnet werden. Es wird von einer höheren Einbaurrate gesprochen, wenn auf ein Molekül Fluoreszenzfarbstoff mehrere Nukleotide kommen, und das Amplikon folglich schwächer markiert ist. Umgekehrt haben stärker markierte PCR-Produkte eine niedrigere Einbaurrate.

2.4. Sequenzierung

Die aufgereinigten nichtmarkierten PCR-Produkte wurden als Vorlage einer anschließenden Sequenzierungsreaktion nach Sanger verwendet. Dazu wurden 200 ng des jeweiligen *gyrA*- bzw. *fimH*-Amplikons in einem Volumen von 20 µl mit 0,4 µM Primer (Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer) und 4 µl des BigDye Terminator cycle sequencing kits gemischt. Die Amplifizierung und Markierung der neu synthetisierten Stränge wurde im Mastercycler ep gradient bzw. Mastercycler ep gradient S mit folgendem Programm durchgeführt: 4 min bei 94 °C; 25 Zyklen à 40 s bei 94 °C, 30 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C; 4 min bei 60 °C. Schließlich wurde die Sequenzierung an einem ABI Prism 377 DNA Sequenzierungsgerät durchgeführt. Alle *fimH*-Varianten wurden dabei jeweils zweimal, die *gyrA*-Varianten nur einmal in beiden Richtungen sequenziert. Die PCR-Produkte der ECOR-Stämme wurden von GATC Biotech AG (Konstanz, Germany) sequenziert. Dabei wurden alle *fimH*-

Tabelle 2-4: Sequenzen aller Oligonukleotide^a

Bezeichnung	5'-3' Sequenz ^b	<i>fimH</i> - bzw. <i>gyrA</i> -Position	T _m (°C) ^c
FimH_1-20f	ATGAAACGAGTTATTACCCT	1-20	48,5
FimH_761-778r	ATACCGTGTTATTCGCTG	761-778	49,5
fimHF	TGATGGGCTGGTCGGTAAATG	35-55	57,4
fimH3R	CGATACCGTGTTATTCGCTGG	760-780	55,7
GyrA_159-176f	CGTACTAGGCAATGACTG	159-176	49,8
GyrA_519-535r	CCATACCTACGGCGATA	519-535	50,4
551_TargetC	Cy3-CGAGCAGAACCATCGCAGC	542-560	59,2
Nuklease_Kontrolle_forw	ACACCTGATCAAGCCTGTTTCATTTGATTAC	-	59,0
Nuklease_Kontrolle_rev	CGCCAAAGAATGATCTGCGGAGCTT	-	61,7
Spottingkontrolle	TCTAGACAGCCACTCATA-Cy3	-	48,9
Pos. Hybridisierungskontrolle	GATTGGACGAGTCAGGAGC	-	55,2
Neg. Hybridisierungskontrolle	TCTAGACAGCCACTCATA	-	48,9
FimH-Prozesskontrolle	TATAATTCGAGAACGGATAAGC	346-367	49,9
GyrA-Prozesskontrolle	AATCTGCCCGTGTCGT	194-210	54,4
FimH_88	GCCAATGGTNCCGCTATCC	79-97	55,8
FimH_142	CTTGCGCCCNCTCGTGAAT	133-150	58,8
FimH_143	TTGCGCCCGNCGTGAATG	134-151	59,0
FimH_160	GTGGGGCAANACCTGGTC	151-168	56,8
FimH_184	GGATCTTTCGACGNAAATCTTT	171-192	53,7
FimH_188	TCGACGCAAANCTTTTGCCAT	178-198	55,8
FimH_247	CAACGAGGCNCGGCTTATG	238-256	56,1
FimH_259	GCTTATGGCNGCGTGTTAT	250-268	55,9
FimH_260	CTTATGGCNGCGTGTTAT	251-268	52,7
FimH_271	GCGTGTTATCTNATTTTTCCG	260-280	49,9
FimH_272	GTGTTATCTANTTTTCCGGG	262-282	49,1
FimH_281	TAATTTTTCCGNGACCGTA	270-288	51,0
FimH_284	TTTCCGGGANCGTAAAATATA	275-295	51,1
FimH_289	CGGGACCGTANAATATAGTG	279-298	50,2
FimH_296	GTAAAATATANTGGCAGTAGC	286-306	48,4
FimH_395	TATTTGACGCNTGTGAGCAG	385-404	55,2
FimH_415	GGCGGGNTGGCGATTA	408-424	61,0
FimH_419	GCGGGGTGGNGATTAAAG	410-427	56,8
FimH_468	GCGACAGACCAANAACATAAC	456-477	53,7
FimH_538	CCTACTNGCGGCTGCGA	532-548	60,7
FimH_551.1 ^d	GCTGCGATGNTTCTGCTCG	542-560	57,0
FimH_551.2	GCTGCGATGNTTCTGCTC	542-559	54,4
FimH_559	TGTTTCTGCTNGTGATGTCA	549-568	54,3
FimH_560	CTGCTCNTGATGTCACC	554-570	53,1
FimH_647	AACCTGGGGTNTTACCTCTC	637-656	53,3
FimH_668	GGCACAACCGNAGATGCG	658-675	60,3
GyrA_248.1	TGGTGACTNGGCGGTCT	240-256	59,0
GyrA_248.2	TGGTGACTNGGCACTCT	"	55,9
GyrA_259.1	GGCGGTCTATNACACGATC	249-267	55,3
GyrA_259.2	GGCGGT7TATNACACGATC	"	53,7
GyrA_260.1	GCGGTCTATGNCACGATC	250-267	52,7
GyrA_260.2	GCGGT7TATGNCACGATC	"	51,0

^a Alle Sonden wurden am 5'-Ende mit einem 11-Thymidinspacer und einer C6-Aminogruppe modifiziert.

^b Für jede SNP-Position wurden vier Sonden entwickelt, die sich nur durch ihre zentrale Base unterscheiden (N = A, G, C oder T). Das Nukleotidtriplekt mit der relevanten Mutation ist jeweils unterstrichen. Zusätzlich wurden zwei häufig vorkommende stille *gyrA*-Mutationen an den Positionen 252 und 255, die hier kursiv dargestellt sind, bei der Entwicklung der Sonden berücksichtigt.

^c Die Schmelztemperaturen aller Sequenzen wurden für die jeweilige Wildtypvariante mit OligoAnalyzer berechnet, wobei Standardbedingungen verwendet wurden (www.idtdna.com).

^d Für die *fimH*-Position 551 wurde zunächst eine längere Sonde entworfen, die für die Genotypisierung jedoch verworfen wurde, jedoch für den Einsatz der Nuklease verwendet werden konnte.

Varianten in beide Richtungen jeweils einmal, die *gyrA*-Varianten nur in eine Richtung sequenziert. Die überlappenden Fragmente wurden gegebenenfalls mittels der SeqMan II Software überlagert und die resultierende Konsensussequenz schließlich mit der Referenzsequenz des *E. coli*-Stammes MG1655 (GenBank Accession Nr. U00096) zur Identifizierung von relevanten Mutationen verglichen.

2.5. Prozessierung der Ziel-DNA

Um die Effektivität der Hybridisierung zu steigern, wurde die fluoreszenzmarkierte Ziel-DNA nach der Aufreinigung in 1x DNase-Puffer verdünnt und unspezifisch mit DNase I in einem Gesamtvolumen von 10 µl verdaut. Dabei wurden bei getrennter Analyse der *fimH*- und *gyrA*-PCR-Produkte jeweils 150 ng DNA mit 0,1 U DNase I, für die simultane Hybridisierung 300 ng DNA mit 0,2 U DNase I für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 3 mM EGTA und Inkubation für 10 min bei 65 °C wurde die unspezifische Fragmentierung gestoppt. Die Fragmentgröße wurde im Anschluss durch Analyse mit Lab-on-a-chip-Elektrophorese kontrolliert.

2.6. Genotypisierung mit allelspezifischen Sonden

2.6.1. Spotting

Alle Sonden wurden in HPLC-Wasser zu einer Konzentration von 100 µM gelöst und schließlich im 1x Spottingpuffer zu einer Endkonzentration von 20 µM verdünnt. Mit Hilfe des MicroGrid II wurden die allelspezifischen Sonden auf die epoxybeschichteten Glasträgeroberflächen im *fimH*-Microarray und im integrierten Array dreifach (im *gyrA*-Microarray fünffach), die Kontrollsonden pro Subarray vierfach gedruckt (Abbildung 2-1 und Abbildung 2-2). Somit ergab sich für den *fimH*-Microarray eine Array-Dimension von 364 Spots, im *gyrA*-Microarray von 136 Spots sowie im kombinierten *fimH/gyrA*-Microarray von 462 Spots, wobei der durchschnittliche Durchmesser der Spots etwa 120 µm betrug. Die gedruckten Arrays wurden zur kovalenten Kopplung der aminomodifizierten Oligonukleotide an die Epoxygruppen der Glasträger im Anschluss für 30 min bei 60 °C in einem Trocknungskompartiment gelagert. Vor der Hybridisierung wurden die Glasträger fünf Minuten in Spüllösung 1, vier Minuten in Spüllösung 2, zehn Minuten in Spüllösung 3 und eine Minute in ddH₂O gewaschen, anschließend 15 min bei 50 °C in der Blocklösung inkubiert, wiederum eine Minute in ddH₂O gewaschen und schließlich unter Stickstofffluss getrocknet.

2.6.2. Hybridisierung und Erfassung der Fluoreszenzsignale

Die fragmentierte markierte DNA wurde mit 0,05 pmol der Ziel-DNA der positiven Hybridisierungskontrolle gemischt, in 70 µl einer 6x SSPE-Lösung verdünnt und innerhalb eines Gene Frames auf den Array aufgetragen und durch einen Coverslip verschlossen. Die Hybridisierung wurde durch Inkubation in einem Thermomixer bei asymmetrischer Rotation von 1200 rpm mit einem austauschbaren Thermoblock für

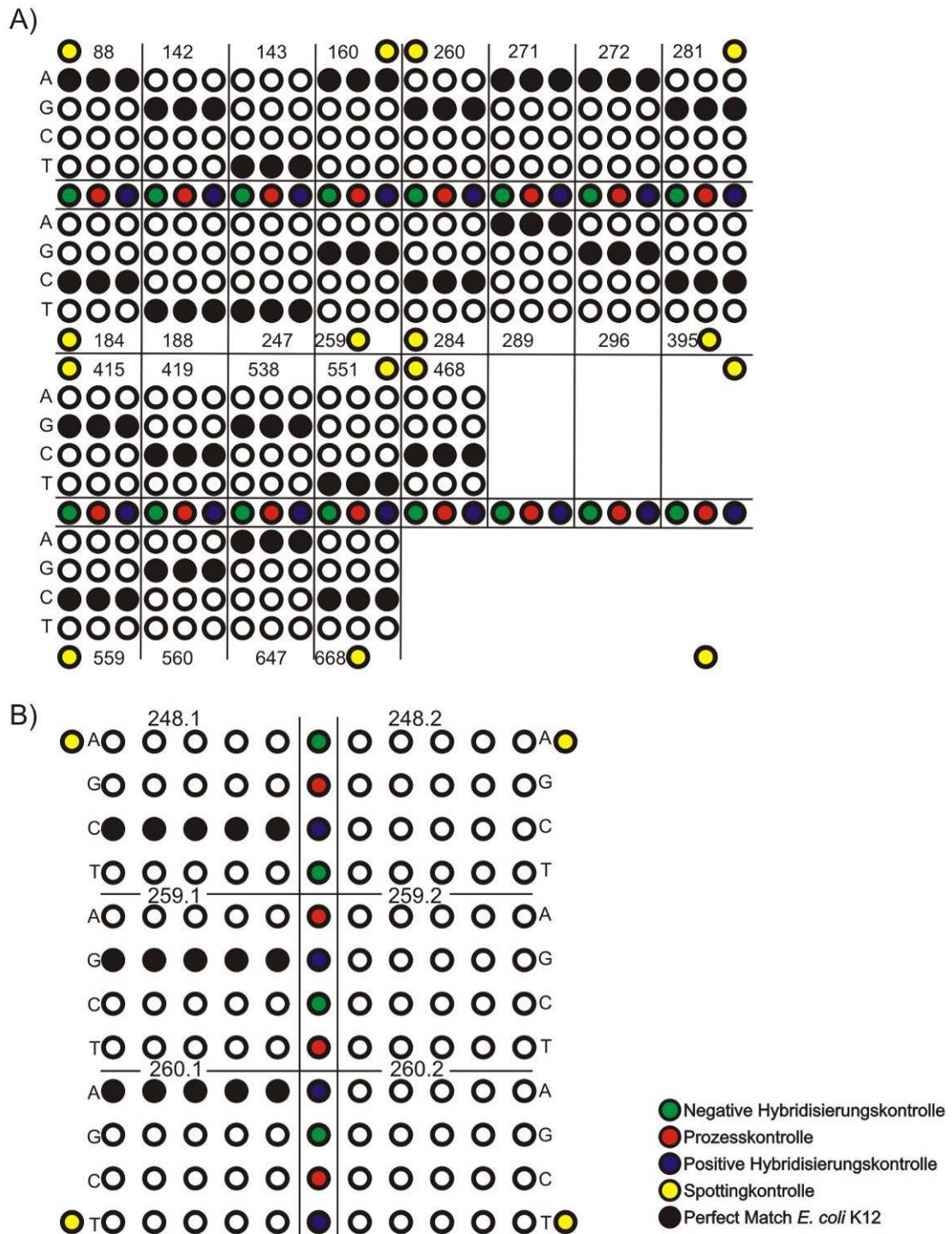


Abbildung 2-1: Layouts des in dieser Arbeit entwickelten *fimH*-Microarrays zur Detektion pathoadaptiver Mutationen (A) und des überarbeiteten *gyrA*-Microarrays zum Nachweis einer potentiellen Fluorchinolonresistenz (B).

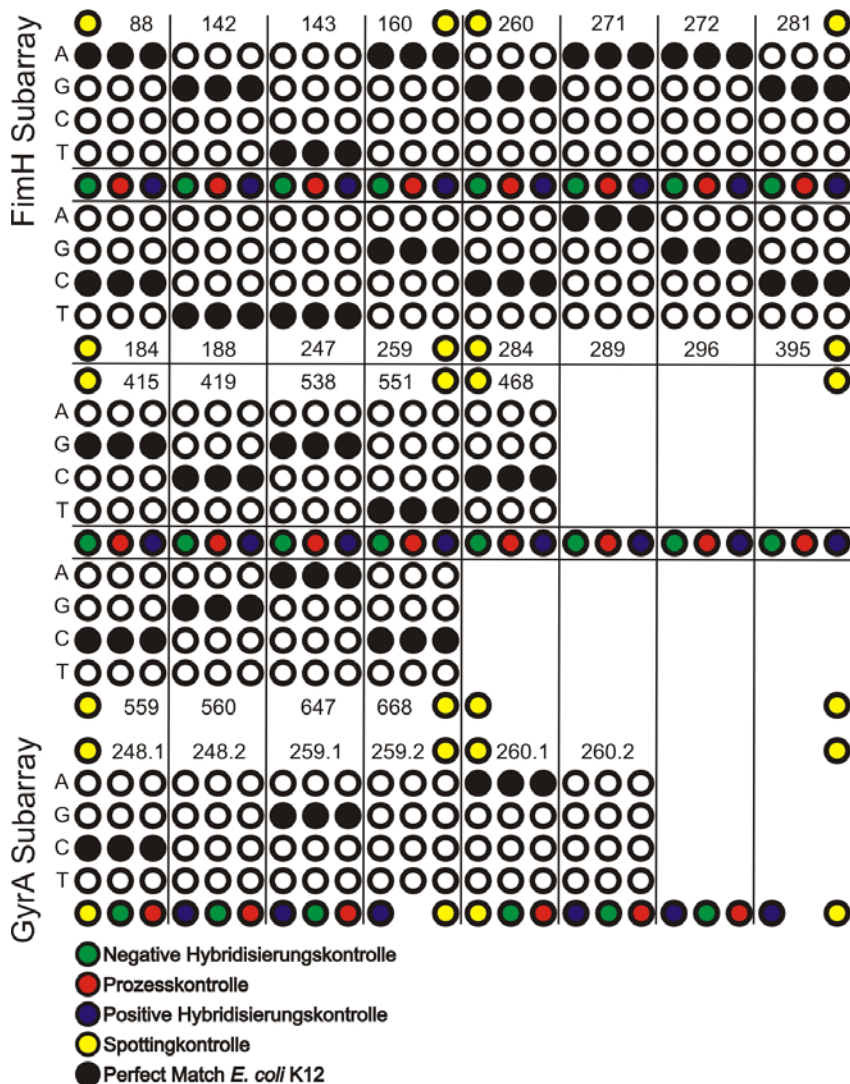


Abbildung 2-2: Layout des integrierten Microarrays zur simultanen Detektion von pathoadaptiven Mutationen in *fimH* und potentieller Fluorochinolonresistenz, die durch Mutationen in *gyrA* nachgewiesen werden kann.

Glasträger durchgeführt. Dabei wurden Inkubationszeiten von 45, 60 und 120 min sowie Hybridisierungstemperaturen von 45, 47, 50 und 52 °C verwendet. Zusätzlich wurden Versuche mit einer 2x SSPE-Lösung und 0,001 % SDS durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Gene Frames entfernt und die Glasträger sukzessive in den Waschlösungen 1, 2 und 3 für jeweils 10 min gewaschen und schließlich unter Stickstofffluss getrocknet. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einem ScanArray Express erfasst, wobei eine Laserstärke von 90 % und in Abhängigkeit von der Einbaurrate des Fluoreszenzfarbstoffs eine PMT zwischen 50 bis 65 gewählt wurde.

2.6.3. Quantifizierung der Fluoreszenzsignale

Die Auswertung der Fluoreszenzsignale wurde mit der ScanArray Express Software durchgeführt, wobei Adaptive Circle als Quantifizierungsmethode gewählt wurde. Die

Intensitäten wurden als CSV-Datei gespeichert und in MS Excel zur automatischen Prozessierung importiert. Dabei wurde für jeden Spot das Nettosignal (Signalmittelwert abzüglich des lokalen Hintergrunds) ausgewertet und der durchschnittliche Wert jedes Spotttriplets sowie die Standardabweichung ermittelt. Für jedes Sondenset wurden das jeweilige maximale Durchschnittssignal als Perfect Match (PM) und die anderen drei Signale jeweils als Mismatch (MM) bezeichnet. Zur Normalisierung wurde die relative Intensität (RI) jedes Spots durch Division des Nettosignals durch den Wert des entsprechenden PM ermittelt. Dadurch resultiert für die drei PM Sonden ein durchschnittlicher RI_{PM} von 100 %, für die MM Sonden ein RI_{MM} von kleiner als 100 %. Zusätzlich wurden für jeden Spot eine relative Standardabweichung sowie der Variationskoeffizient ermittelt. Zur Beurteilung eines jeden Experiments wurde für jeden Array die mittlere relative Intensität mRI als Durchschnitt aller RI_{MM} berechnet.

Für die Untersuchung der Spotqualität wurden drei Methoden verwendet. Zum einen wurde der jeweilige Variationskoeffizient einer Spotintensität durch

$$CV_{\text{spot}} = FSD / F_{\text{mean}} \quad (2)$$

mit der Standardabweichung der Pixelintensitäten eines Spots (FSD) und der mittleren Pixelintensität eines Spots (F_{mean}) berechnet (Sauer et al. 2005). Dabei ist dieser Wert umso niedriger, je homogener die Pixelintensitäten verteilt sind.

Als zweite Methode wurde eine Korrelation zwischen Median- und Mittelwert der jeweiligen Pixelintensität aufgestellt:

$$K = \text{Minimum}(F_{\text{mean}}, F_{\text{median}}) / \text{Maximum}(F_{\text{mean}}, F_{\text{median}}) \quad (3)$$

Dabei ist F_{median} der Medianwert der einzelnen Pixelintensitäten eines Spots (Tran et al. 2002). K sollte im Idealfall dabei eins betragen. Je stärker die Pixelintensitäten voneinander abweichen, desto geringer wird der K-Wert.

Schließlich wurde jeder einzelne Spot durch den so genannten Qualitätsindex q_{com1} beschrieben (Wang et al. 2001). Dieser beinhaltet zusätzliche Informationen über Pixelgröße, Rauschen, Sättigung und Hintergrundsignale und berechnet sich mit

$$q_{\text{com1}} = (q_{\text{size}} \cdot q_{\text{sig-noise}} \cdot q_{\text{bkg1}} \cdot q_{\text{bkg2}})^{1/4} \cdot q_{\text{sat}}, \quad (4)$$

wobei

$$\begin{aligned} q_{\text{size}} &= \exp(-|F_{\text{pixel}} - F_{\text{pixel0}}| / F_{\text{pixel0}}), \\ q_{\text{sig-noise}} &= F_{\text{mean}} / (F_{\text{mean}} + B_{\text{mean}}), \\ q_{\text{bkg1}} &= f_1 / (BSD / B_{\text{mean}}) \\ &\quad \text{mit } f_1 = 1 / \max(BSD / B_{\text{mean}}), \\ q_{\text{bkg2}} &= f_2 \cdot (bkg0) / (bkg0 + B_{\text{mean}}) \\ &\quad \text{mit } f_2 = 1 / \max[(bkg0)/(bkg0 + B_{\text{mean}})], \\ \text{Wenn } \% \text{sat} &\leq 10, \text{ dann } q_{\text{sat}} = 1, \text{ sonst } 0 \end{aligned}$$

definiert sind. Dabei ist F_{pixel} die Anzahl der Spotpixel, F_{pixel0} die auf einem Array durchschnittliche Anzahl an Spotpixel, B_{mean} der Mittelwert der jeweiligen lokalen Hintergrundintensitäten, BSD die Standardabweichung des lokalen Hintergrunds, bkg0 der globale Durchschnitt des Hintergrunds pro Array und $\% \text{sat}$ der prozentuale Anteil an gesättigten Pixeln pro Spot. Alle Qualitätsmaße q sind Werte zwischen 0 und 1. Allgemein beschreibt q_{size} die Abweichung der Spotgröße, $q_{\text{sig-noise}}$ ist ein Maß für das Signal-Hintergrund-Rauschen, q_{bkg1} die Veränderlichkeit des lokalen Hintergrunds und q_{bkg2} die Höhe des lokalen Hintergrunds.

Zusätzlich wurden zwei Varianten des Qualitätsindex q_{com2} und q_{com3} nach Sauer und Mitarbeitern berechnet (Sauer et al. 2005):

$$q_{\text{com2}} = (q_{\text{size}} \cdot q_{\text{sig-noise}} \cdot q_{\text{bkg1}} \cdot q_{\text{bkg2}} \cdot q_{\text{F}})^{1/5} \cdot q_{\text{sat}} \quad (5)$$

mit $q_{\text{F}} = f3 \cdot (F_{\text{Median}} / F_{\text{Median0}})$
und $f3 = 1 / \max (F_{\text{Median}} / F_{\text{Median0}})$,

$$q_{\text{com3}} = (q_{\text{size}} \cdot q_{\text{sig-noise}} \cdot q_{\text{bkg1}} \cdot q_{\text{bkg2}} \cdot q_{\text{CV}})^{1/5} \cdot q_{\text{sat}} \quad (6)$$

mit $q_{\text{CV}} = f4 \cdot (FSD / F_{\text{Mean}})$
und $f4 = 1 / \max (FSD / F_{\text{Mean}})$.

Dabei ist F_{Median0} das globale Mittel der Medianintensitäten. Im Vergleich zu q_{com1} beinhalten q_{com2} die absolute Signalintensität und q_{com3} den Variationskoeffizienten innerhalb eines Spots.

Die 3D-Darstellung der Spotintensitäten zur optischen Einschätzung der Intensitätsverteilungen innerhalb eines Spots wurde mittels der Software ICS-501 Image Capture durchgeführt.

2.7. Versuche mit der mismatchspezifischen Surveyor Nuclease

2.7.1. Spaltung von Heteroduplexen in Lösung

Zur Kontrolle der Nukleaseaktivität in Lösung wurde ein Kontrollversuch durchgeführt. Dabei wurden zwei 632 bp lange DNA-Stränge, die sich nur in einem Nukleotid unterscheiden (Guanosin bzw. Cytosin an Position 415) durch PCR mit den Primern Nuklease_Kontrolle_forw und Nuklease_Kontrolle_rev amplifiziert. Nach Kontrolle der Fragmentlänge über Gelelektrophorese wurden jeweils 15 μl beider Ansätze gemischt, durch Erhitzen aufgeschmolzen (94 °C für 2 min) und schließlich durch moderates Abkühlen (94 °C \rightarrow 85 °C mit -2 °C/s und anschließend 85 °C \rightarrow 25 °C mit -0,1 °C/s) hybridisiert. Dabei entstehen theoretisch jeweils 25 % der beiden Homoduplexe sowie der beiden möglichen Heteroduplexe. Zur Kontrolle wurden jeweils 30 μl beider PCR Produkte getrennt mitbehandelt. Jeweils 8 μl der drei Ansätze wurden mit 1 μl der Nuklease-Lösung sowie 1 μl eines aktivitätsfördernden Detergens (Enhancer) gemischt und für 20 min bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl Stop-Lösung abgebrochen. Anschließend wurden zur Überprüfung der DNA-Fragmente die Produkte durch Gelelektrophorese untersucht.

2.7.2. Einsatz der Nuklease auf einem DNA-Microarray

Die *fimH*-Sonden der Position 551.1, die sich im Laufe der Arbeit durch eine ungenügende Diskriminierung zwischen PM- und MM-Signalen auszeichneten, wurden wie oben beschrieben auf Glasträger gedruckt und immobilisiert. Dabei wurden die vier Sonden dieses SONDENSATZES, wie in Abbildung 2-3 dargestellt, jeweils 20fach, die Spottingkontrolle jeweils sechsfach und die Sonden der positiven und negativen Hybridisierungskontrolle jeweils dreifach gedruckt. Dies ergibt eine Dimension von 92 Spots pro Array (Abbildung 2-3). Die Sonden wurden wie oben beschrieben immobilisiert und die Arrays ebenso geblockt. Für die Hybridisierung wurden 0,05 pmol 551_TargetC mit 0,05 pmol positiver Hybridisierungskontrolle gemischt, in 6x SSPE verdünnt und wie oben beschrieben hybridisiert (2 h bei 50 °C) und anschließend gewaschen und getrocknet, so dass die Fluoreszenzsignale des Arrays vor der Behandlung mit der Nuklease erfasst werden konnten.

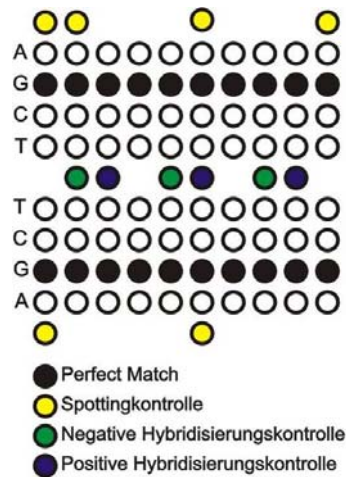


Abbildung 2-3: Arraylayout des *fimH*-SONDENSATZES 551.1, der zur Untersuchung der Nukleaseaktivität verwendet wurde.

Im Anschluss wurde der Verdau mit einer Mischung aus 1 µl Surveyor Nuclease, 1 µl Detergens und 1x Taq-Puffer innerhalb eines Gene Frames auf den Array aufgetragen, mit einem Cover Slip bedeckt und für 20 min bei 42 °C im Thermomixer durchgeführt. In einem zweiten Ansatz wurde der gleiche Ansatz ohne Detergens verwendet; außerdem wurde als Kontrolle 1x Taq-Puffer auf einen dritten Array gegeben. Nach der Inkubation wurden die Arrays abschließend mit 0,2x SSC für 10 min gewaschen, unter Stickstofffluss getrocknet und die Fluoreszenzsignale ein zweites Mal eingescannt, wobei in diesen Versuchen eine PMT 50 für die allelspezifischen Sonden bzw. PMT 35 für die Kontrollsonden verwendet wurden. Die Signalreduktion (SR) aufgrund der Behandlung mit der Nuklease wurde durch

$$SR = 1 - SV/SH \quad (7)$$

mit SH = Signalintensität nach Hybridisierung und SV = Signalintensität nach Verdau bestimmt. Die Nettosignalreduktion (nSR) eines Ansatzes X (X = Nuklease oder Nuklease mit Detergens) wurde berechnet durch:

$$nSR = SR_X - SR_{\text{Kontrolle}} = SV_{\text{Kontrolle}}/SH_{\text{Kontrolle}} - SV_X/SH_X \quad (8)$$

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung eines Assays zur Detektion von *fimH*-Mutationen

3.1.1. Sequenzanalyse und Sondendesign

Durch Homologiesuche in Blastn mit der *fimH*-Sequenz des Referenzstammes *E. coli* MG1655 wurden insgesamt 70 weitere *E. coli*-Nukleotidsequenzen extrahiert, die einen E-Wert von 0.0 aufwiesen. Diese Sequenzen wurden in BioEdit untereinander verglichen und insgesamt 79 polymorphe Positionen in dem 903 Basen großen *fimH*-Gen identifiziert. Darunter befanden sich 47 stille Mutationen, d.h. sie führten zu keinem Aminosäureaustausch, und 31 Mutationen, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hatten (Abbildung 3-1). Die *fimH*-Sequenz des Laborstammes W3110 entspricht der Sequenz des K12 Stammes MG1655 und konnte ebenso als Referenz herangezogen werden.

```

1   ATGAAACGAG TTATTACCCT GTTTGCTGTA CTGCTGATGG GCTGGTCGGT
51  AAATGCCTGG TCATTTCGCT GTAAAACCGC CAATGGTACC GCTATCCCTA
101 TTGGCGGTGG CAGCGCCAAT GTTTATGTAA ACCTTGCGCC CGTCGTGAAT
151 GTGGGGCAAA ACCTGGTTCGT GGATCTTTTCG ACGCAAATCT TTTCCATAA
201 CGATTATCCG GAAACCATTA CAGACTATGT CACACTGCAA CGAGGCTCGG
251 CTTATGGCCG CGTGTATATCT AATTTTTCGG GGACCGTAAA ATATAATGGC
301 AGTAGCTATC CATTTCCTAC CACCAGCGAA ACGCCGCGCG TTGTTTATAA
351 TTCGAGAACG GATAAGCCGT GGCCGGTGGC GCTTTATTTG ACGCTGTGA
401 GCAGTGCGGG CCGGGTGGCG ATTAAAGCTG GTCATTAAT TGCCGTGCTT
451 ATTTTGCGAC AGACCAACAA CTATAACAGC GATGATTTCC AGTTTGTGTG
501 GAATATTTAC GCCAATAATG ATGTGGTGGT GCCTACTGGC GGCTGCATG
551 TTTCTGCTCG TGATGTCACC GTTACTCTGC CGGACTACC TGGTTCAGTG
601 CCAATTCCTC TTACCGTTTA TTGTGCGAAA AGCCAAAACC TGGGGTATTA
651 CCTCTCCGGC ACAACCGCAG ATGCGGGCAA CTCGATTTTC ACCAATACCG
701 CGTCGTTTTT ACCTGCACAG GGCGTCGGCG TACAGTTGAC GCGCAACGGT
751 ACGATTATTC CAGCGAATAA CACGGTATCG TTAGGAGCAG TAGGACTTTC
801 GGCGGTGAGT CTGGGATTAA CGGCAAATTA TGACGTACC GGAAGGCAGG
851 TGACTGCAGG GAATGTGCAA TCGATTATTG GCGTGACTTT TGTTTATCAA
901 TAA

```

Abbildung 3-1: *fimH*-Nukleotidsequenz des Referenzstammes MG1655 mit den identifizierten Mutationen. Alle stillen Mutationen sind gelb und die Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, rot markiert, wobei die in dieser Arbeit berücksichtigten Mutationen zusätzlich unterstrichen sind.

Weiterhin wurde die FimH-Aminosäuresequenz des Referenzstammes verwendet, um in Blastp homologe Sequenzen zu finden; dabei wurden 90 Proteinsequenzen mit einem E-Wert von $<10^{-100}$ in Genbank gefunden. Zusätzlich wurden weitere Mutationen aus unterschiedlichen Publikationen entnommen. Ein Sequenzvergleich in BioEdit ergab, dass von den insgesamt 38 identifizierten Mutationen sechs in der Targetsequenz (AS 1-21), 24 in der Lektin-Untereinheit (AS 22-177; bzw. im reifen Protein 1-156) und acht in der Pilin-Untereinheit (181-300; bzw. im reifen Protein 160-279) des Proteins lagen (Abbildung 3-2). Zusätzlich wurden weitere Mutationen aus eigenen Sequenzierungen der Referenzstämme BEN79, BEN2908, BEN374, IHE3034, 536, W3110, U15508 und U33041 berücksichtigt (Abbildung 3-3). Für das Sondendesign wurden schließlich 13 Mutationen aus der Sequenzanalyse, die in

Ergebnisse

```

1   MKRVIILFAY LLMGWSVNAW SFACKTANGT AIPIGGGSAN VYVNLAPVVN
51  VGQNLVVDLS TQLFCHNDYP ETITDYVTLQ RGSAYGCVLS NFSGTVKYSG
101 SSPFPTTSE TPRVVYNSRT DKPWPVALYL TVSSAGGVA IKAGSLI AVL
151 ILROTNYNS DDFQFVWNIY ANNDVVVPTG GCDVSARDVT VTLPDYFGSV
201 PIPLTVYCAK SQNIGVYLSG TTADAGNSIF TNTASFSPAQ GVGVQLTRNG
251 TIIPANNTVS LGAVGTSAVS LGLTANYART GGQVTAGNVQ SIIGVTFVYQ
  
```

Abbildung 3-2: FimH-Aminosäuresequenz des Referenzstammes W3110 mit den rot markierten Mutationen, die durch Proteinalignment bzw. Literaturrecherche identifiziert wurden. Davon wurden 19 Mutationen in dieser Arbeit berücksichtigt und sind hier unterstrichen. Im Vergleich zu den folgenden Aminosäurebezeichnungen sind hier die ersten 21 Aminosäuren der Targetsequenz berücksichtigt.

allen Quellen häufiger als einmal beschrieben wurden, elf Mutationen aus Literaturquellen und zwei Mutationen, die in den Referenzstämmen identifiziert wurden, berücksichtigt (Tabelle 3-1). Sämtliche stille Mutationen wurden vernachlässigt. In Abbildung 3-4 sind die absoluten Häufigkeiten der für das Sondendesign berücksichtigten Mutationen in den extrahierten DNA- und Proteinsequenzen, in den unterschiedlichen Publikationen sowie in den Sequenzen aus den eigenen Versuchen dargestellt. Dabei fiel in erster Linie die Häufigkeit der Mutation V27A auf, die in mehr als der Hälfte aller Sequenzen (61,2 %) vorkam.

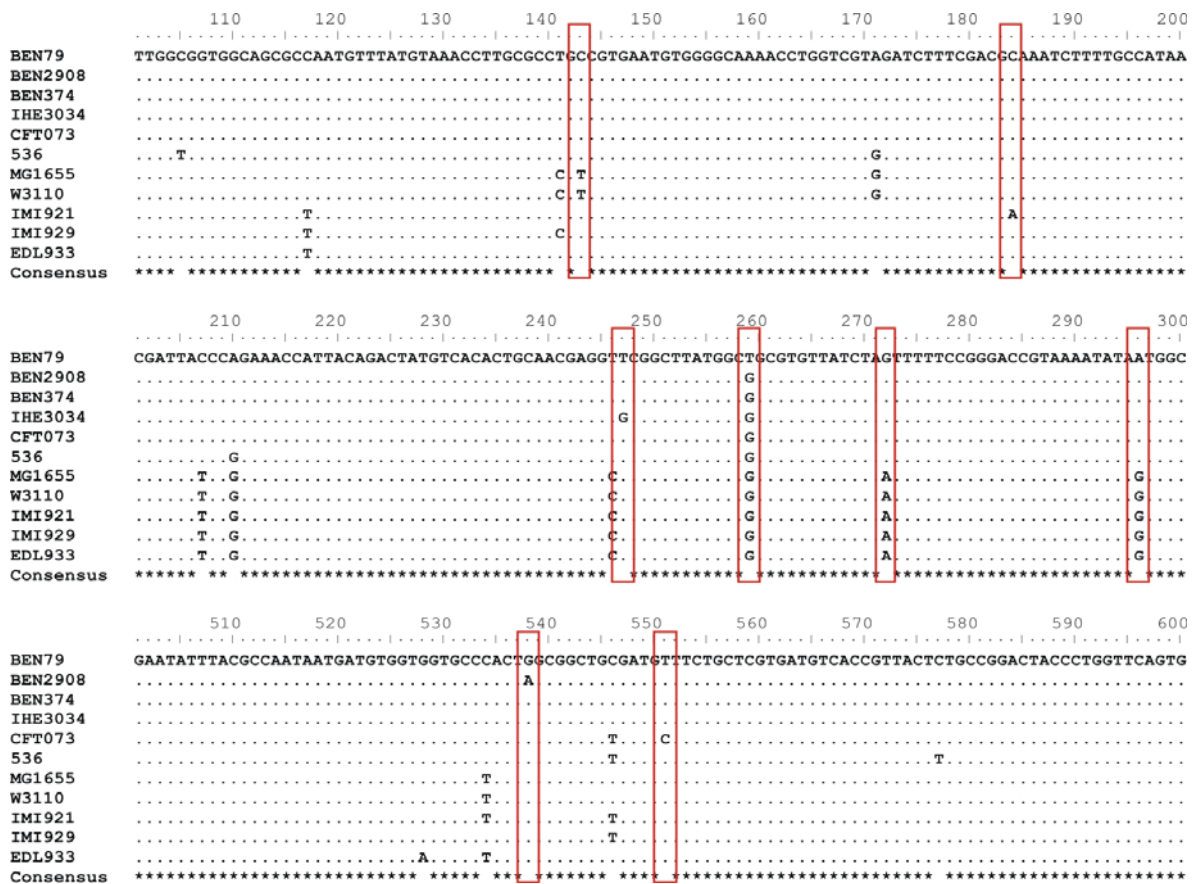


Abbildung 3-3: Ausschnitte aus dem DNA-Sequenzalignment der Referenzstämmen. In den rot markierten Kästen sind alle identifizierten Mutationen (Nukleotidpositionen 143, 184, 247, 259, 272, 296, 538 und 551) aufgeführt, die zu einem Aminosäureaustausch führen und damit potentiell pathoadaptiv sind.

Tabelle 3-1: *fimH*-Polymorphismen, die in dieser Arbeit berücksichtigt wurden

SNP	<i>fimH</i> -Position	Genbank Accession Nummer	Referenz
T9A	88	AAR27568	(Vandemaele et al. 2004)
V27T	142	-	(Hommais et al. 2003)
V27A	143	NP_757248	(Welch et al. 2002)
N33H	160	-	(Sokurenko et al. 1998)
Q41K	184	-	eigene Sequenzierung (IMI921)
I42T	188	-	(Hung et al. 2002)
S62A	247	AAG60686	(Pouttu et al. 1999)
G66S	259	AAR27558	(Hommais et al. 2003)
G66C	259	-	(Hommais et al. 2003)
G66D	260	-	(Sokurenko et al. 1998)
N70S	272	NP_757248	(Welch et al. 2002)
N70H	271	-	(Hommais et al. 2003)
G73E	281	-	(Sokurenko et al. 1998)
T74I	284	ZP_00737660	(Hung et al. 2002)
K76E	289	-	(Hung et al. 2002)
S78N	296	NP_757248	(Welch et al. 2002)
P111L	395	-	(Sokurenko et al. 1998)
V118L	415	-	(Hung et al. 2002)
A119V	419	AAR27555	(Vandemaele et al. 2004)
N135K	468	BAB38702	(Perna et al. 2001)
G159S	538	-	eigene Sequenzierung (BEN2908)
V163A	551	NP_757248	(Welch et al. 2002)
R166C	559	-	(Sokurenko et al. 1998)
R166H	560	AAO84615	(Vandemaele et al. 2003)
Y195F	647	AAR27568	(Vandemaele et al. 2004)
A202V	668	AAR275581	(Vandemaele et al. 2004)

Zusätzlich traten die beiden Mutationen N70S (24,8 %) und S78N (27,1 %) vorwiegend in Kombination auf. Daneben kamen die anderen aufgelisteten Mutationen nur in Kombination mit der dominanten Mutation V27A vor. Der Aminosäureaustausch V27T resultierte aus zwei *fimH*-Mutationen: 142 G→A und 143 T→C und wurde durch die Kombination der beiden SONDENSÄTZE 142 und 143

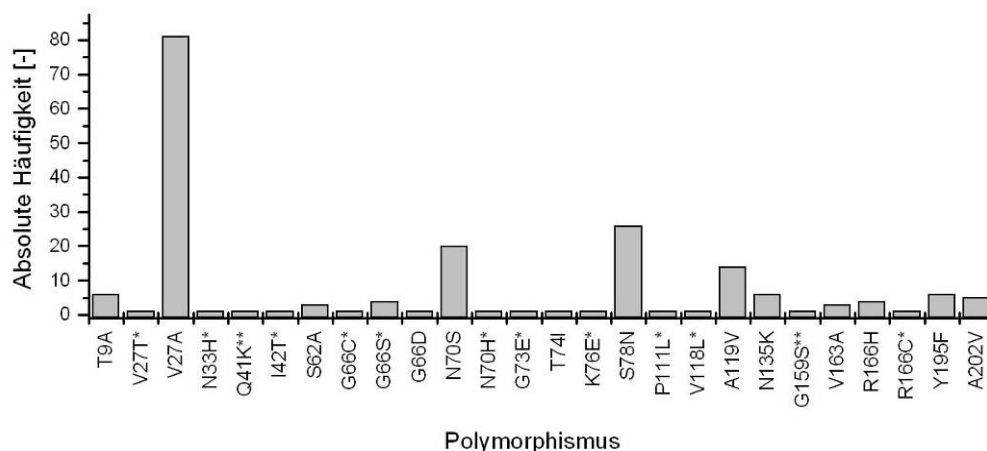


Abbildung 3-4: Absolute Häufigkeit der für das Sondendesign berücksichtigten Mutationen in DNA- und Proteinsequenzen, unterschiedlichen Publikationen (*) und in Sequenzen aus eigenen Sequenzierungen der zehn Referenzstämme (**).

nachgewiesen. Die beiden Polymorphismen G66C und G66S ergaben sich aus zwei unterschiedlichen Mutationen der *fimH*-Position 259 (G→T bzw. G→A). Die Mutationen N135K bzw. S62A wurden nach Literaturangaben direkt in Zusammenhang mit dem enterohämorrhagischen Serotyp O157:H7 (Hung et al. 2002) bzw. mit meningitisassoziierten *E. coli*-Varianten (Pouttu et al. 1999) in Verbindung gebracht. Ansonsten konnten keine Zusammenhänge zwischen klinischen Symptomen und spezifischen Mutationen in der FimH-Untereinheit festgestellt werden.

3.1.2. Etablierung der Amplifizierung von *fimH*

Für die Amplifizierung des *fimH*-Gens wurde zunächst auf die publizierten Primer *fimHF* und *fimH3R* zurückgegriffen (Hommais et al. 2003), die in einem PCR-Produkt von 745 Basenpaaren resultierten. Jedoch zeigte die Amplifizierung sowohl des *fimH*-Gens des Referenzstammes *E. coli* MG1655 bei moderaten

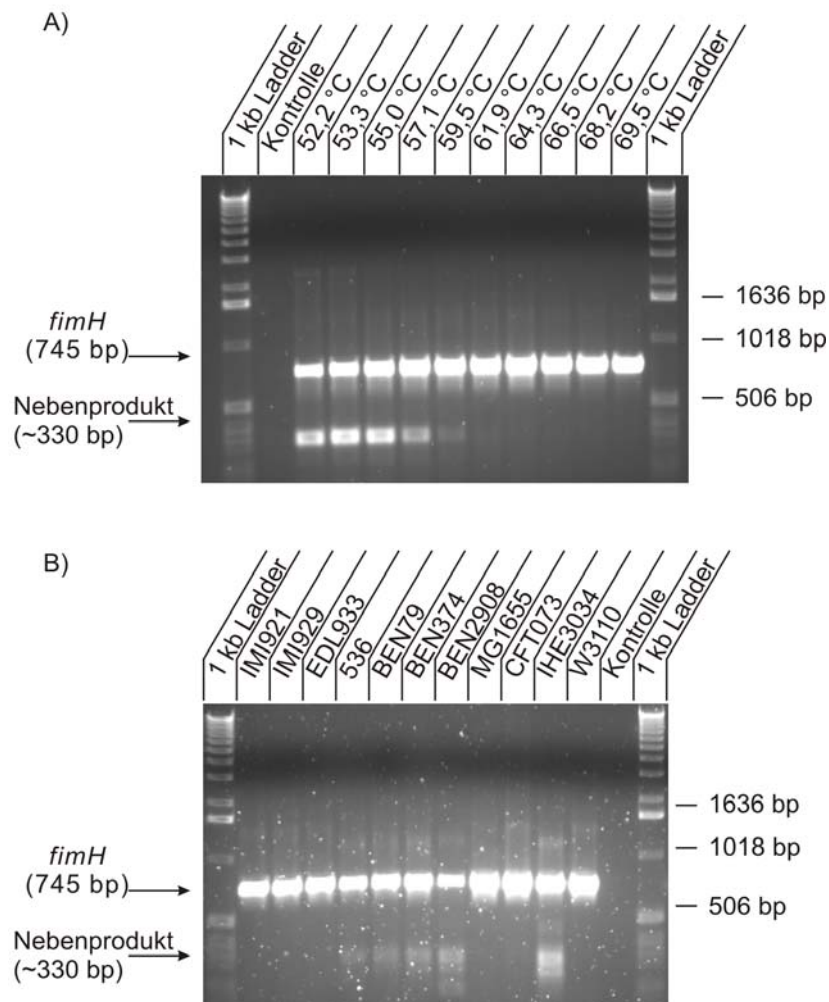


Abbildung 3-5: Amplifizierungsreaktionen mit den von Hommais et al. veröffentlichten Primern *fimHF* und *fimH3R* (Hommais et al. 2003). A) Gradienten-PCR mit genomischer DNA von *E. coli* W3110 mit Annealingtemperaturen zwischen 52,2 und 69,5 °C. B) Amplifizierung von *fimH* aus der genomischen DNA von elf Stämmen bzw. klinischen Isolaten, die als Referenzen dienten. Als Annealingtemperatur wurde in diesem Fall 64,3 °C gewählt.

Annealingtemperaturen (bis zu 59 °C) als auch die Amplifizierung der *fimH*-Gene der weiteren neun Referenzstämmen bei einer erhöhten Annealingtemperatur von 64,3 °C neben dem eigentlichen PCR-Produkt von 745 Basenpaaren ein unerwünschtes Nebenprodukt von etwa 330 Basenpaaren (Abbildung 3-5). Deswegen wurden für diese Arbeit die Primer FimH_1-20f und FimH_761-778r mit um etwa 7 °C niedrigeren Schmelztemperaturen entworfen (Tabelle 2-4), die ein PCR-Produkt von 778 Basenpaaren lieferten. Weder die Amplifizierung des *fimH*-Gens von *E. coli* MG1655 bei verschiedenen Annealingtemperaturen in einer Gradienten-PCR noch die Amplifizierung der *fimH*-Gene der anderen Referenzstämmen bei einer moderaten Annealingtemperatur von 55,0 °C wiesen nach der PCR im Agarosegel noch ein unerwünschtes Nebenprodukt auf (Abbildung 3-6). Deswegen wurden die Primer fimHF und fimH3R verworfen und sämtliche weitere Amplifizierungen und Sequenzierungen mit den Primern FimH_1-20f und FimH_761-778r durchgeführt.

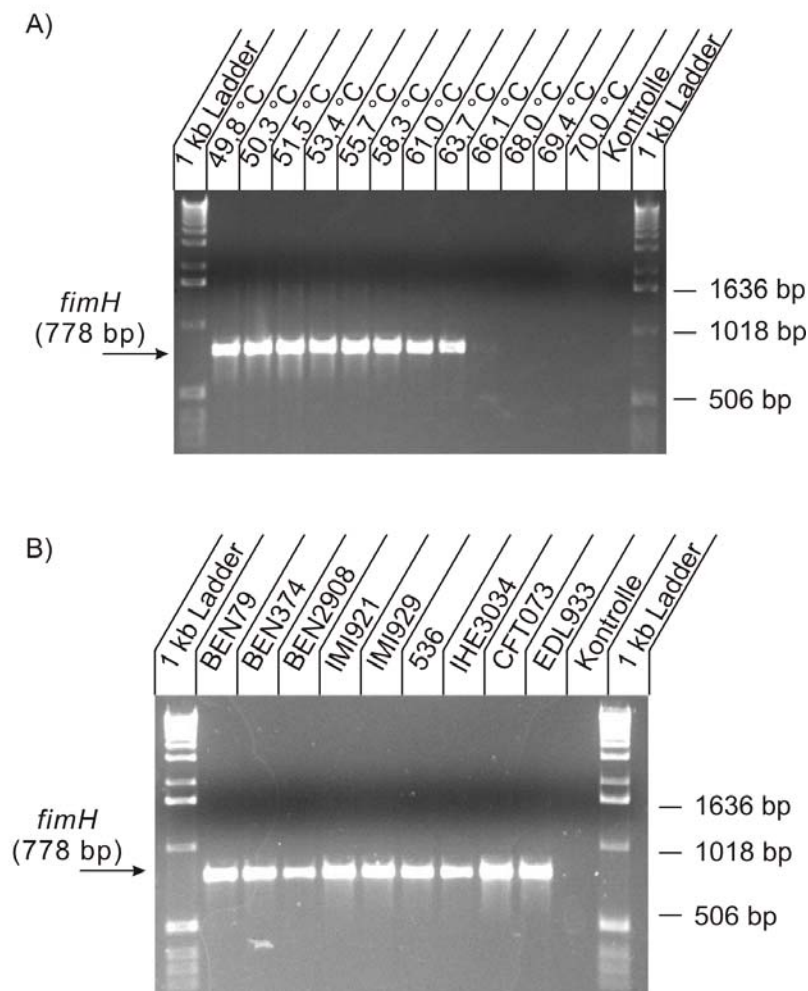
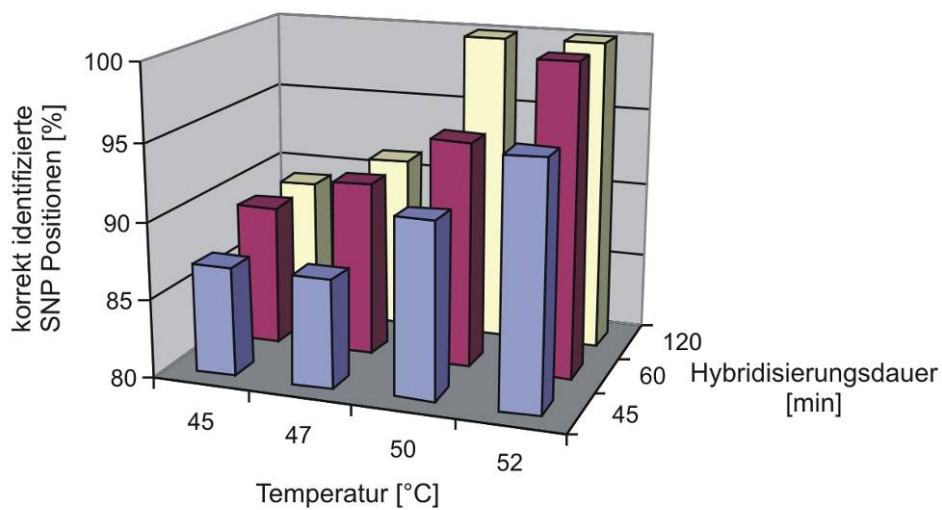


Abbildung 3-6: Ergebnis von Amplifizierungsreaktionen mit den in dieser Arbeit verwendeten Primern FimH_1-20f und FimH_761-778r. A) Gradienten-PCR mit genomischer DNA von *E. coli* W3110 mit Annealingtemperaturen zwischen 49,8 und 70,0 °C. B) Amplifizierung von *fimH* aus der genomischen DNA von 9 Stämmen bzw. klinischen Isolaten, die als Referenz dienen. Als Annealingtemperatur wurde 55 °C gewählt.

3.1.3. Optimierung der Parameter für die Hybridisierung

Um geeignete Bedingungen für die Hybridisierung zu finden, die bei einer möglichst hohen Diskriminierung (d.h. einem möglichst niedrigen mRI) die korrekte Identifizierung aller Positionen garantierten, wurden die Sonden mit dem Cy3-markiertem *fimH*-Amplikon des Referenzstammes MG1655 bei Hybridisierungstemperaturen zwischen 45 und 52 °C sowie bei Inkubationszeiten zwischen 45 und 120 min getestet. In Abbildung 3-7 ist sowohl der Anteil an korrekt identifizierten Positionen sowie der jeweilige mRI dargestellt, wobei jedes Experiment zweimal durchgeführt wurde. Daraus wurde ersichtlich, dass erst bei einer

A)



B)

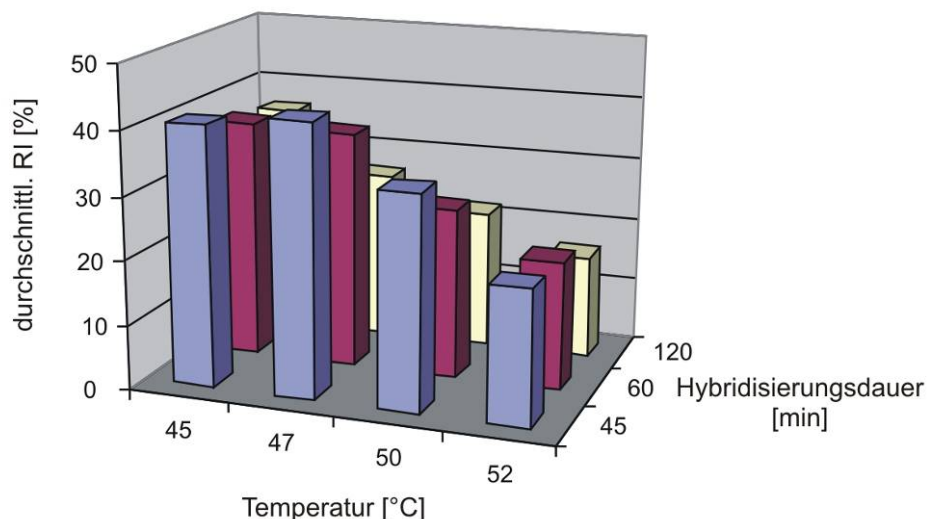


Abbildung 3-7: Hybridisierungen mit *E. coli* MG1655-*fimH* zur Bestimmung der optimalen Hybridisierungsbedingungen. Dargestellt ist der Einfluss der Hybridisierungstemperatur und der -dauer auf die Anzahl an korrekt identifizierten SNP Positionen (A) bzw. auf die Diskriminierung zwischen MM und PM; hierzu wurde der jeweilige Mittelwert von zwei unabhängigen Versuchsansätzen berechnet.

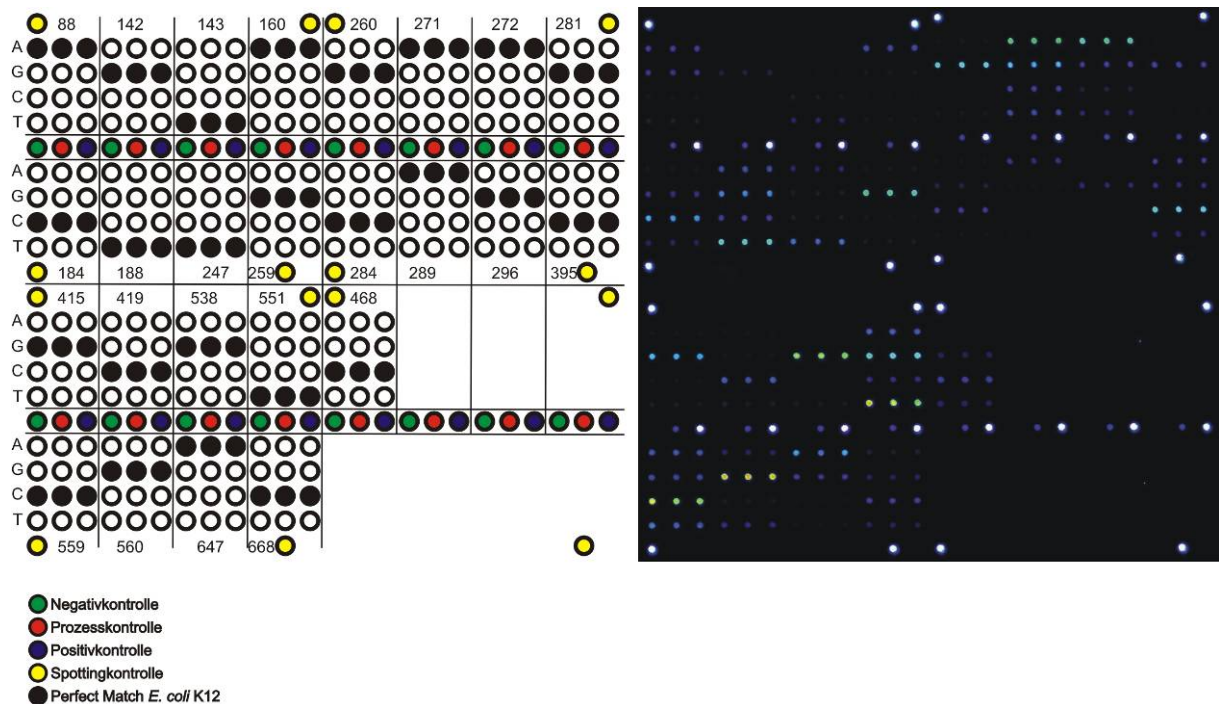


Abbildung 3-8: Layout des *fimH*-Microarrays und ein Fluoreszenzbild in Falschfarbendarstellung einer Hybridisierung bei Standardbedingungen mit der *fimH*-Variante von *E. coli* W3110.

Hybridisierungstemperatur von 50 °C und einer Inkubationszeit von 120 min alle Positionen korrekt identifiziert wurden (Abbildung 3-8); dies ist für die weitere Untersuchung von Blindproben unerlässlich. Zusätzlich konnte der mRI von 41,6 % (45 °C / 45 min) durch die stringenteren Bedingungen auf 16,2 % (52 °C / 120 min) gesenkt werden. Hybridisierungen bei 52 °C wiesen teilweise sehr niedrige absolute Fluoreszenzsignale auf. Dies könnte bei der Untersuchung anderer Isolate, bei denen stille Mutationen in den Sondenbereichen des Gens zu einer weiteren Reduktion der Signale geführt hätten, zu Problemen bei der Quantifizierung führen. Deswegen wurden die Bedingungen 50 °C / 120 min, bei denen alle Positionen korrekt identifiziert wurden und ein mRI von 21,8 % erzielt wurde, als Ausgangspunkt für die weitere Optimierung gewählt.

Tabelle 3-2: Ergebnisse von Hybridisierungen mit MG1655-*fimH*, bei denen durch Reduktion der Salzkonzentration eine höhere Stringenz eingestellt wurde.

SSPE	SDS	PMT	durchschn. PM/MM	durchschn. PM
6x		50	21,8 %	~17000
2x		50	14,7 %	~10200
0,5x		50	10,3 %	~1500
2x	0,0001 %	50	18,1 %	~ 11900
2x	0,001 %	50	13,7 %	~ 11200
2x	0,01 %	50	13,7 %	~ 12000

Durch Verwendung einer niedrigeren Salzkonzentration während der Hybridisierung konnte die Stringenz zusätzlich erhöht werden. Die Ergebnisse dieser Versuche mit der *fimH*-Variante des Referenzstamms sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst, wobei

Ergebnisse

sämtliche Parameter jeweils zweimal getestet wurden. Dabei wurde deutlich, dass durch die Erniedrigung der Salzkonzentration von 6x SSPE auf 2x SSPE und 0,5x SSPE die Diskriminierung signifikant verbessert werden konnte; damit geht jedoch eine deutliche Reduktion der Signalstärke einher; dies könnte wiederum bei stillen Mutationen in den Sondenbereichen zu Problemen führen. Deswegen wurde eine Salzkonzentration von 2x SSPE für die weiteren Untersuchungen verwendet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von 0,001 % SDS bei einer verbesserten Diskriminierung die absoluten Signale geringfügig verstärkt wurden.

Zusammenfassend wurden folgende Parameter für die Untersuchung aller Proben verwendet:

- Hybridisierungsdauer: 120 min
- Hybridisierungstemperatur: 50 °C
- Salzkonzentration: 2x SSPE
- Additiv: 0,001 % SDS

Mit diesen Bedingungen wurde die *fimH*-Variante des Laborstammes W3110 getestet, deren Sequenz der MG1655-Variante entspricht (Abbildung 3-8). Die absoluten Fluoreszenzsignale sowie die RIs sind in Abbildung 3-9 dargestellt. Darin wurde ersichtlich, dass sich die absoluten Signale auf Werte zwischen 1500 und

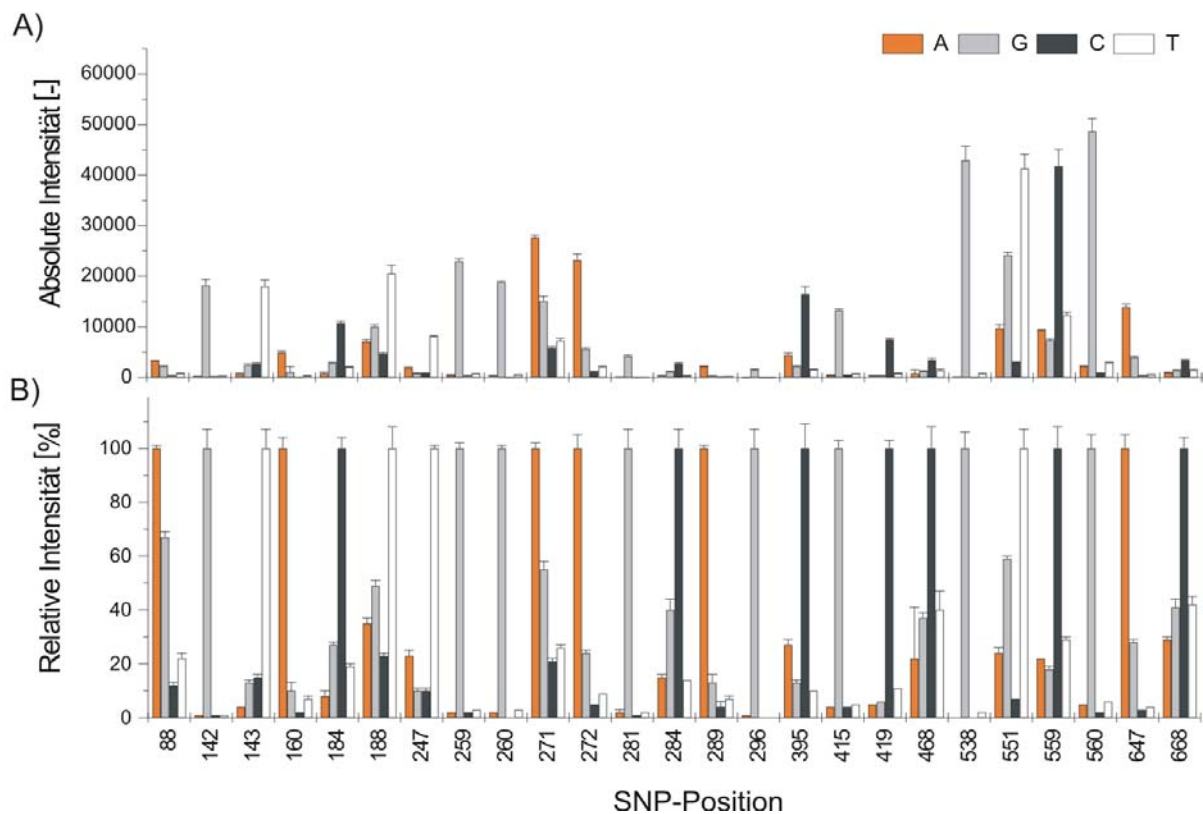


Abbildung 3-9: Absolute (A) und relative Intensitäten (B) eines Hybridisierungsexperimentes mit der *fimH*-Variante des Laborstammes *E. coli* W3110.

48000 Fluoreszenzeinheiten beliefen. Der mRI betrug 15,0 %, wobei 86,7 % aller MM einen RI_{MM} von weniger als 30 %, 66,7 % aller MM einen RI_{MM} von weniger als 20 % und 52 % aller MM einen RI_{MM} von weniger als 10 % haben. Die schlechteste Diskriminierung wurde für $RI_{88G} = 66,9 \%$, $RI_{551G} = 58,6 \%$ und $RI_{271G} = 54,7 \%$ berechnet (Abbildung 3-9).

3.1.4. Hybridisierungsexperimente mit weiteren Referenzstämmen

Zur Validierung des Microarrays wurden mit den in 3.1.3 ermittelten Hybridisierungsparametern die *fimH*-Varianten von neun weiteren Referenzstämmen (BEN79, BEN2908, BEN374, IHE3034, CFT073, 536, U15508, U33041 und EDL933) getestet. Zusammenfassend konnten dadurch neun der insgesamt 26 Mutationen validiert werden, die durch den Microarray abgedeckt sind: V27A, Q41K, S62A, G66C, N70S, S78N, N135K, G159S und V163A (Abbildung 3-3). In Abbildung 3-10 ist beispielhaft ein Fluoreszenzbild einer Hybridisierung mit der *E. coli* 536-*fimH*-Variante dargestellt. Bereits ohne Quantifizierung waren alle auftretenden Mutationen ablesbar. Der Nukleotidaustausch von Thymidin zu Cytosin an Position 143 resultierte in der Mutation V27A, der Austausch von Adenosin zu Guanosen an Position 272 ergab die Mutation N70S und der Austausch von Guanosen zu Adenosin resultierte in der Mutation S78N. In Abbildung 3-11 sind alle identifizierten Mutationen in den verwendeten Referenzstämmen zusammengefasst. Dabei wurde eine Position, die das gleiche Ergebnis wie der Referenzstamm lieferte, als korrekt-negativ bezeichnet; eine durch den Microarray identifizierte Abweichung vom Wildtyp wurde als korrekt-positives Ergebnis bezeichnet. Der Vergleich dieser Resultate mit

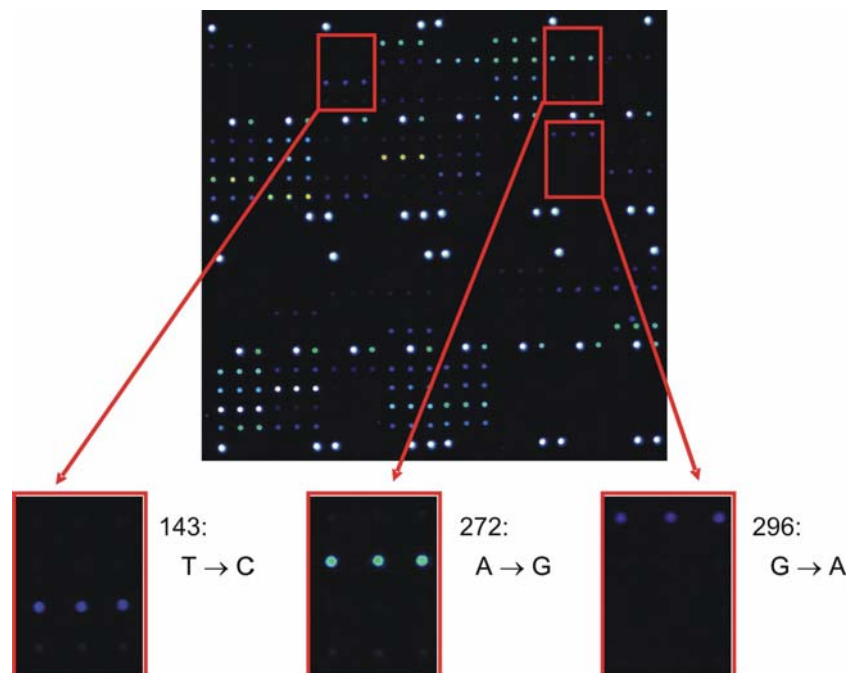


Abbildung 3-10: Beispielhafte Hybridisierung von *E. coli* 536. Die drei Mutationen V27A, N70S und S78N können durch die Signale der allelspezifischen Sonden der Positionen 143, 272 und 296 abgelesen werden.

Ergebnisse

Stamm bzw. Isolat (phyl. Gruppe)	Serotyp	Symptom	T9A	V27T	V27A	N33H	Q41K	I42T	S62A	G66S	G66C	G66D	N70H	N70S	G73E	T74I	K76E	S78N	P111L	V118L	A119V	N135K	G159S	V163A	R166C	R166H	Y195F	A202V
U15822 (B1)	O153:H31	chronische UTI																										
U33041 (D)	O2:H42	chronische UTI																										
EDL933 (A)	O157:H7	EHEC																										
BEN2908 (B2)	nd	ExPEC																										
BEN374 (B2)	nd	ExPEC																										
BEN79 (B2)	nd	ExPEC																										
IHE3034 (B2)	O18:K1:H7	MNEC																										
536 (B2)	O6:K15:H31	Pyelonephritis																										
CFT073 (B2)	O6:H1:K?	Pyelonephritis																										

■ korrekt positiv ■ korrekt negativ

Abbildung 3-11: Durch allelspezifische Hybridisierung mit dem *fimH*-Microarray identifizierte Mutationen in den neun Referenzstämmen.

den Sequenzierungen bzw. den veröffentlichten Sequenzen ergab keine Diskrepanzen (keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse).

In Abbildung 3-12 sind beispielhaft alle relativen Intensitäten eines Experiments mit der *fimH*-Variante des klinischen Isolates *E. coli* U33041 dargestellt. Durch Vergleich der PM mit denen des Referenzstammes (siehe Abbildung 3-9) konnte in diesem Fall die einzige Mutation V27A, die durch den Austausch von Thymidin zu Cytosin an Position 143 resultierte, in diesem Isolat eindeutig identifiziert werden. Dabei betrug in diesem Fall der mRI 14,4 %, wobei 84 % aller MM einen RI_{MM} von weniger als 30 %, 68 % aller MM einen RI_{MM} von weniger als 20 % und 60 % aller MM einen RI_{MM} von weniger als 10 % haben. Die schlechteste Diskriminierung wurde in diesem Fall für $RI_{88G} = 62,7 \%$, $RI_{271G} = 58,2 \%$ und $RI_{188G} = 56,1 \%$ berechnet.

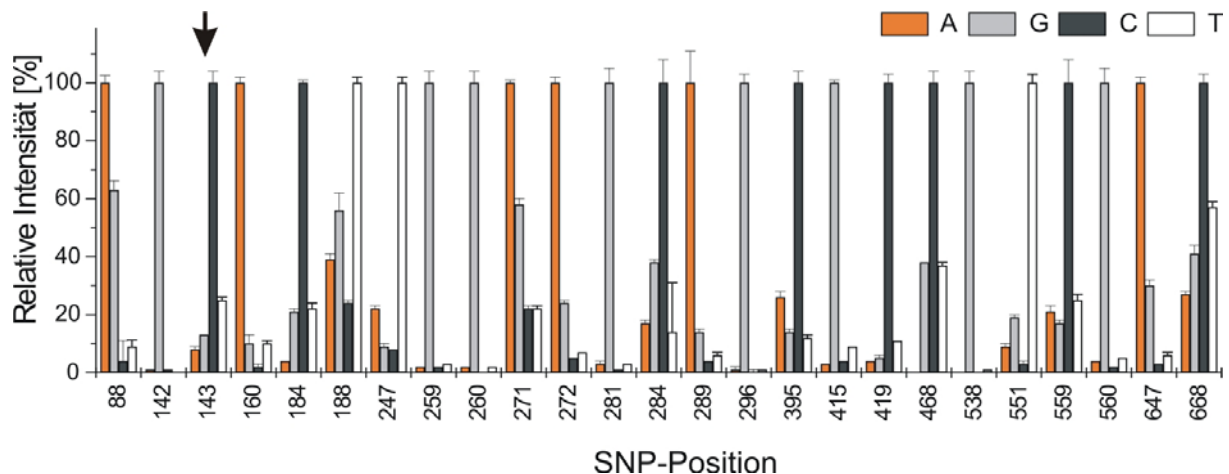


Abbildung 3-12: Relative Intensitäten eines Hybridisierungsexperiments mit der *fimH*-Variante von *E. coli* U33041. Die von der Referenzsequenz abweichende Position 143 ist mit einem Pfeil markiert.

3.1.5. Sensitivität des Assays

Ein entscheidender Aspekt für die klinische Anwendung der Chiptechnologie ist die Sensitivität des Assays. Um die Nachweisgrenze des entwickelten Microarrays zu untersuchen, wurden 5 fg (entspricht einem *E. coli* K12-Genom mit 4,76 Mio Basenpaaren) bis 50 ng (entspricht in etwa 10^7 Genomäquivalenten) DNA des Referenzstammes W3110 als Eingangsmaterial für die Amplifizierung mit dem standardmäßigen PCR-Programm verwendet. PCR-Produkte konnten durch optische Kontrolle mit einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel bis zu Ansatz 4 (50 pg an genomischer DNA als Ausgangsmaterial) nachgewiesen werden (Abbildung 3-13). Die DNA-Konzentrationen der markierten PCR-Produkte der Ansätze 3 bis 8 (500 pg bis 5 fg) wurden nach Aufreinigung gemessen, wobei das Detektionslimit (2 ng DNA / μ l) der Spektrophotometrie noch bei Ansatz 4 (50 pg) erreicht wurde. In diesem Fall wurde eine DNA-Konzentration von 3,4 ng DNA / μ l gemessen; im Ansatz 5 (5 pg) wurde eine DNA-Konzentration von 0,8 ng DNA / μ l gemessen, was einer Gesamtmenge von 25 ng an PCR-Produkt entsprach. In den Proben mit weniger Ausgangsmaterial konnte über Spektrophotometrie keine DNA mehr detektiert werden.

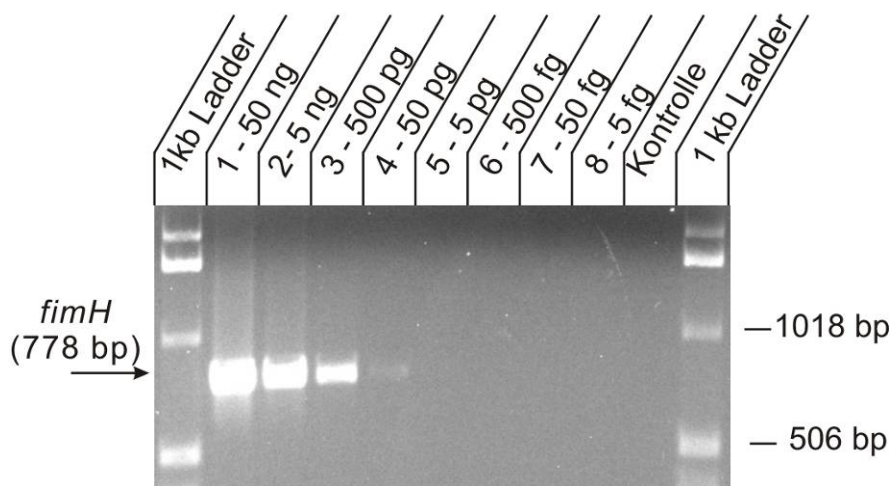


Abbildung 3-13: Darstellung des ethidiumbromidgefärbten Agarosegels zur Kontrolle der PCR-Produkte nach der *fimH*-Amplifizierung mit unterschiedlichen Ausgangsmengen an genomischer DNA für die PCR.

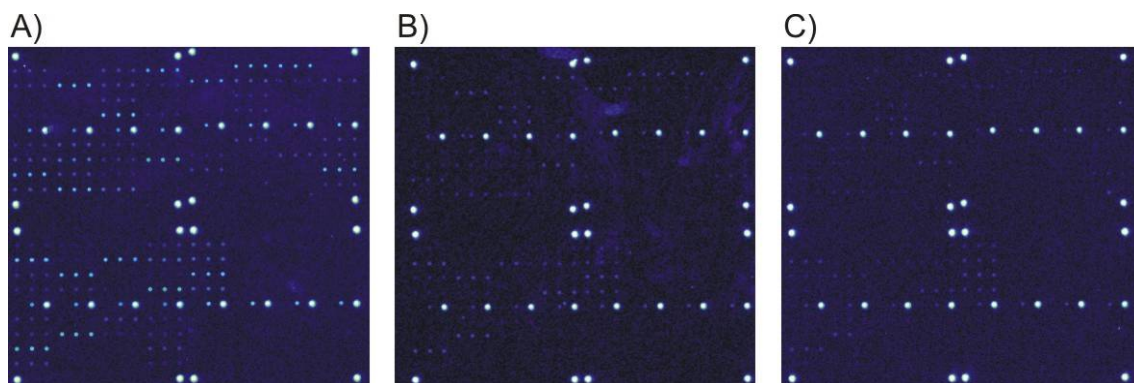


Abbildung 3-14: Fluoreszenzbilder der Hybridisierungen mit den PCR-Produkten aus den Ansätzen, bei denen A) 5 pg, B) 500 fg und C) 50 fg genomische DNA als Ausgangsmaterial verwendet wurden. Dabei wurden der Array A mit PMT 75 und die beiden Arrays B und C mit PMT80 eingescannt.

Ergebnisse

In Abbildung 3-14 sind die Fluoreszenzbilder der Hybridisierungen mit den markierten PCR-Produkten aus den Ansätzen 5 bis 7 (5 pg, 500 fg und 50 fg) dargestellt. Während in den Ansätzen 4 (50 pg, nicht dargestellt) und 5 (5 pg) eine quantitative Auswertung mit vergleichbarer Diskriminierung (Tabelle 3-3) zwischen den PM- und MM-Sonden möglich war, konnten in Ansatz 6 (500 fg) zwar noch Sondersignale detektiert werden, eine SNP-Analyse war allerdings nicht mehr möglich. Ab Ansatz 7 (50 fg) können die meisten Signale nicht mehr vom Hintergrund unterschieden werden. Damit wurde das Detektionslimit des Assays zur eindeutigen SNP-Analyse auf 5 pg genomische DNA (oder 1000 Genomäquivalente) als Eingangsmaterial für die PCR festgelegt.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Sensitivität des Assays

Ansatz	Eingangsmaterial für PCR	Ausbeute an PCR-Produkt	PMT	durchschn. PM	mRI
1	50 ng ^c	1800 ng ^a	55	~19000	14,6 %
3	500 pg	590 ng	-	-	-
4	50 pg	100 ng	65	~23000	14,1 %
5	5 pg	~25 ng ^b	75	~13000	14,2 %
6	500 fg	-	80	-	-
7	50 fg	-	80	-	-
8	5 fg	-	80	-	-

^a Für die Hybridisierung wurden 150 ng des PCR-Produktes verwendet

^b Schätzwert über Spektrophotometrie; der Messwert lag unterhalb des Detektionslimits

^c Referenzversuch

3.1.6. Reduktion der Assayzeit

Ein entscheidender Vorteil der Arraytechnologie ist die potentiell schnelle Assayzeit. Um diesen Aspekt bei der Entwicklung dieses Assays zu berücksichtigen, wurden



Abbildung 3-15: Fluoreszenzbild einer Hybridisierung mit einem nicht fragmentierten PCR-Produkt. Auffallend sind die sehr niedrigen Signale der Sonden, die das 5'-Ende des Gens abdecken und die hohen Signale der Sonden am 3'-Ende des Fragments, die auch bei einigen MM-Sonden bis zur Sättigung reichen.

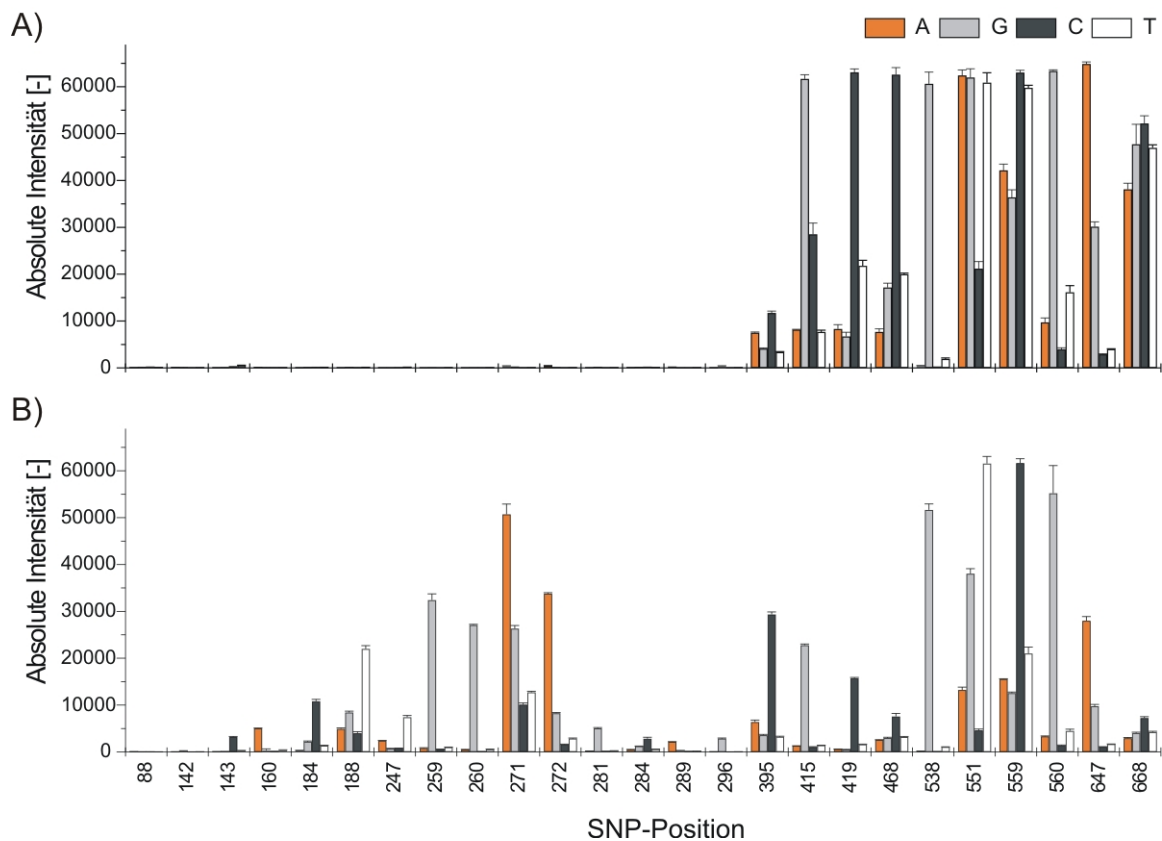


Abbildung 3-16: Vergleich der absoluten Intensitäten der Hybridisierung einer *fimH*-Variante A) ohne und B) mit Verdau.

verschiedene Strategien verfolgt. In einem ersten Ansatz wurde untersucht, ob die routinemäßig eingesetzte unspezifische Fragmentierung der Ziel-DNA für die Hybridisierung notwendig war. Dazu wurde das aufgereinigte markierte PCR Produkt direkt auf dem Microarray hybridisiert. In Abbildung 3-15 ist ein Falschfarbenbild der Fluoreszenzsignale dieser Hybridisierung dargestellt. Während Sonden vor der Position 395 signifikant niedrigere Werte lieferten, war bei den Sonden, die das 3'-Ende des Gens abdecken, ein sehr starkes Fluoreszenzsignal festzustellen, das bei einigen MM-Sonden in der Sättigung lag (Abbildung 3-16). In beiden Fällen war somit eine eindeutige SNP-Identifizierung nicht möglich, so dass dieser Ansatz zur Reduktion der Assayzeit verworfen wurde. Es war offensichtlich, dass durch die Fragmentierung deutlich gleichmäßigere Signale für die verschiedenen SONDENSÄTZE auf dem Array unabhängig von der Sondenposition erzielt wurden.

In einem anderen Ansatz wurde die Prozesszeit der Amplifizierung des *fimH*-Zielgens sowohl über eine Reduktion der Dauer der verschiedenen PCR-Schritte (Denaturierung, Annealing und Verlängerung) als auch über eine Reduktion der Zyklenzahl der PCR verringert. Die zusätzlichen variablen Schritte der initialen Denaturierung (2 min) und finalen Verlängerung (4 min) wurden nicht verändert. Als Ausgangspunkt der Reduktion wurde das Programm von 30 Zyklen à 30 s Denaturierung, 30 s Annealing und 60 s Verlängerung (kurz 30-30-60) verwendet, das insgesamt 120 s pro Zyklus dauerte. Zusätzlich wurde durch die Umstellung vom Mastercycler ep gradient auf den Mastercycler ep gradient S, der mit einem

Ergebnisse

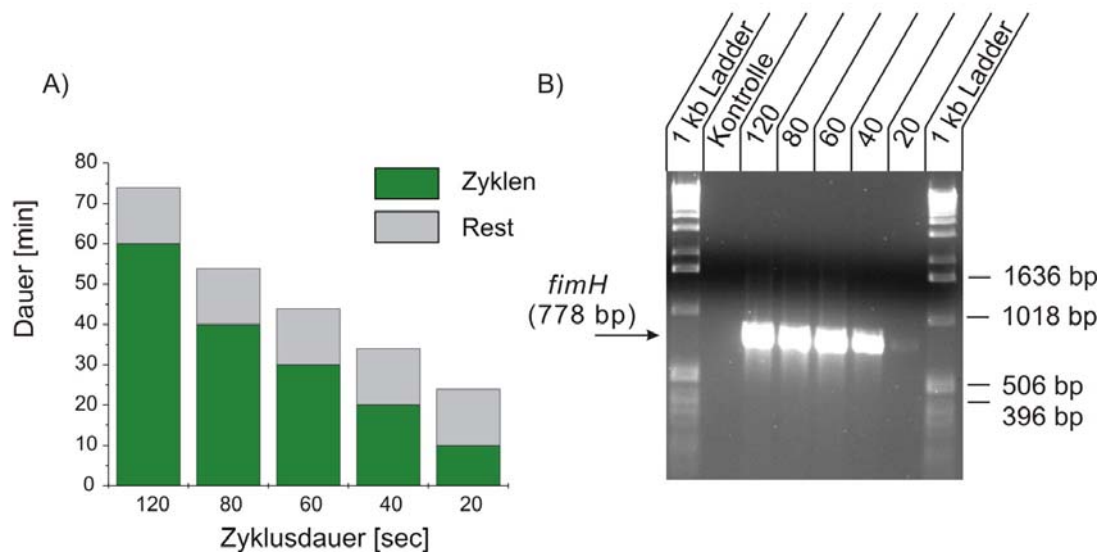


Abbildung 3-17: A) Einfluss der Dauer der einzelnen Prozessschritte der PCR auf die Gesamtdauer der Amplifizierung (Rest = Initiale Denaturierung, Aufwärm-/Kühlzeiten während der Amplifizierung und finale Verlängerung), B) Ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel zur Kontrolle der nichtmarkierten PCR-Produkte nach der Amplifizierung.

Silberblock mit deutlich höheren Heiz- und Kühlraten ausgestattet ist, bei gleichem Programm die Prozesszeit von 88 auf 74 min verringert.

Im nächsten Schritt konnten bei stufenweiser Reduktion der verschiedenen PCR-Schritte auf 20-20-40 (Zyklendauer: 80 s, Gesamtdauer: 54 min), 15-15-30 (60 s; 44 min) und 10-10-20 (40 s; 34 min) durch Kontrolle der PCR-Produkte auf einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel noch deutliche Banden nachgewiesen werden (Abbildung 3-17). Erst bei einer weiteren Verkürzung der PCR auf 5-5-10 (20 s; 24 min) wurde signifikant weniger PCR-Produkt beobachtet. In einem dritten Schritt wurde das Programm 10-10-20 durch Reduktion der Zyklenzahl von 30 Zyklen (Gesamtdauer: 34 min) auf 26 (30 min), 22 (26 min), 18 (22 min) und 14 Zyklen

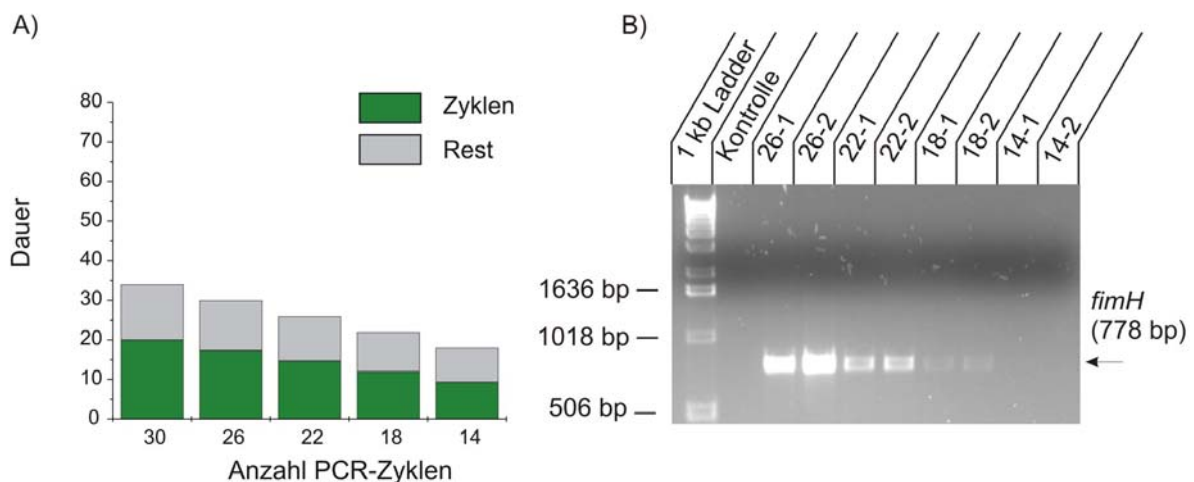


Abbildung 3-18: A) Einfluss der Reduktion der PCR Zyklen auf die Gesamtdauer der Amplifizierung (Rest = Initiale Denaturierung, Aufwärm-/Kühlzeiten während der Amplifizierung und finale Verlängerung), B) Ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel zur Kontrolle der nichtmarkierten PCR-Produkte nach der Amplifizierung.

(18 min) reduziert. Diese Versuche wurden jeweils doppelt ausgeführt. Wie in Abbildung 3-18 ersichtlich konnte noch bei einem PCR-Programm aus 18 Zyklen ein Amplifizierungsprodukt nachgewiesen werden. Dieses Programm aus 18 Zyklen à 10 s Denaturierung, 10 s Annealing und 20 s Verlängerung wurde schließlich genutzt, um eine Markierungs-PCR mit 50 ng der genomischen DNA des Referenzstammes MG1655 durchzuführen. Dabei konnten schätzungsweise 50 ng an markiertem PCR-Produkt gewonnen werden, das vollständig zur Hybridisierung eingesetzt wurde. Die quantitative Auswertung ergab für dieses Experiment bei einer höheren PMT-Einstellung des Scanners eine ähnliche Diskriminierung wie beim Referenzversuch (Tabelle 3-4). Damit wurde gezeigt, dass ein 22 min dauerndes PCR-Protokoll für eine eindeutige SNP-Analyse prinzipiell ausreichend war; dies bedeutete für die Assayzeit eine Reduktion von etwa einer Stunde.

Tabelle 3-4: Ergebnisse der Hybridisierung eines markierten Amplikons einer 22 min dauernden PCR im Vergleich mit dem Referenzversuch

Dauer der PCR	Ausbeute an PCR Produkt	PMT	durchschn. PM	mRI
75 min	1800 ng	55	~19000	14,6 %
22 min	~ 50 ng	70	~22000	15,0 %

Schließlich konnte gezeigt werden, dass durch eine Reduktion der Hybridisierungszeit auf 60 min - aufgrund der niedrigeren Salzkonzentration im Vergleich zu 3.1.3 bei stringenteren Hybridisierungsbedingungen - für zwei Versuche alle Positionen korrekt ausgelesen werden konnten. Allgemein wurde jedoch eine etwas schlechtere Diskriminierung beobachtet (Tabelle 3-5). Für den Referenzstamm wurde eine Erhöhung des mRI von 14,6 % auf 18,5 % und für das klinische Isolat U15672 von 14,1 % auf 16,6 % berechnet. Prinzipiell ist somit eine zusätzliche Verkürzung der Assayzeit um eine weitere Stunde möglich.

Tabelle 3-5: Ergebnisse der Hybridisierung bei Reduktion der Hybridisierungszeit im Vergleich mit den jeweiligen Referenzversuchen bei Standardbedingungen

Stamm	mRI bei Hybridisierung für 2 h	mRI bei Hybridisierung für 1 h
MG1655	14,6 %	18,5 %
U15672	14,1 %	16,6 %

Zusammenfassend konnten für die einzelnen Prozessschritte dieses Assays folgende Zeiten veranschlagt werden:

- Amplifizierung durch PCR: 30 min
- Aufreinigung des PCR-Produkts: 15 min
- Unspezifischer DNA-Verdau: 30 min
- Hybridisierung: 60 min
- Waschen der Arrays: 30 min
- Datenerfassung / Auswertung 15 min

Mit einer großzügigen Annahme von zusätzlichen 30 min für Schritte der Handhabung resultierte eine Gesamtdauer von dreieinhalb Stunden für die komplette Durchführung der *fimH*-Genotypisierung nach der DNA-Isolierung.

3.2. Untersuchung von *fimH*-Varianten

3.2.1. Klinische Isolate

Nach der Etablierung und Validierung des Microarrays wurden die *fimH*-Varianten von 50 weiteren *fimH*-positiven Isolaten (Tabelle 2-2) als verblindete Proben untersucht und im Anschluss zur Überprüfung der Ergebnisse sequenziert. Die Resultate der Hybridisierungen sind im Vergleich mit der Validierung durch Sequenzierung in Abbildung 3-19 zusammengefasst. Es konnten weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse beobachtet werden. Zusätzlich wurden durch Sequenzierung drei weitere, bisher noch nicht beschriebene Mutationen in den Blindproben identifiziert. So wurde in dem UPEC-Isolat RZ422 die Mutation V163F gefunden, das uropathogene Isolat wies die Mutation P102S auf und in dem asymptomatischen Isolat ABU12 wurde die Mutation A106V nachgewiesen.

Insgesamt wurden mit dem Microarray zehn verschiedene Mutationen in den verblindeten Proben nachgewiesen, von denen vier Mutationen in den Referenzstämmen (3.1.4) nicht gefunden wurden: G66S, T74I, A119V und R166H. In dieser Übersicht wurde deutlich, dass ein einzelnes Isolat bis zu vier Mutationen aufweisen konnte. Die Mutation V27A ist auch in diesen Proben die dominante FimH-Mutation, die in Kombination mit weiteren Mutationen auftrat.

Die beiden Mutationen N70S und S78N traten stets gemeinsam in Verbindung mit V27A in 18 von 24 Isolaten (75 %) auf, die zu der phylogenetischen Gruppe B2 gehörten. Außerdem wurde in dieser Gruppe viermal keine Mutation (16,7 %) identifiziert, was dem Phänotyp des Referenzstammes entsprach. Weiterhin wurde zweimal das Muster V27A / R166H (8,3 %) nachgewiesen. In den insgesamt 13 Isolaten des Serotyps O153:H31, die aus der selben phylogenetischen Gruppe B1 stammten, wurde stets die gleiche Mutationskombination V27A / Q41K identifiziert. Drei weitere Isolate aus dieser Gruppe hatten keine Mutation; nur das asymptomatische Isolat ABU62 wies die einzelne Mutation V27A auf. Isolate aus der phylogenetischen Gruppe A zeigten entweder die Kombination von V27A / A119V (2 von 4) oder ebenfalls keine Mutation (2 von 4). Schließlich konnten in der phylogenetischen Gruppe D verschiedene Mutationskombinationen gefunden werden: keine Mutation (1 von 5), V27A (1 von 5), V27A / A119V (1 von 5) und V27A / G66C (2 von 5).

Aus diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Symptomen der Patienten und dem FimH-Muster hergestellt werden konnte. Lediglich die Mutation V62A, die bereits aus dem MNEC-Stamm IHE3034 bekannt ist, wurde in dem MNEC-Isolat RS218 gefunden und konnte somit in Verbindung mit Meningitis gebracht werden.

Neben diesen qualitativen Untersuchungen wurden sämtliche Experimente quantitativ ausgewertet. Über alle Versuche hinweg wurde mit dem entwickelten Microarray ein durchschnittlicher mRI von $16,3 \pm 1,9$ % erzielt. Abbildung 3-20 gibt

Stamm bzw. Isolat (phyl. Gruppe)	Serotyp	Symptom	V27A	Q41K	S62A	G66S	G66C	N70S	T74I	S78N	A119V	R166H
AC/1 (B1)	nd	APEC										
ABU12 (B2)	nd	asymptomatisch										
ABU16 (B2)	nd	asymptomatisch										
ABU20 (B2)	nd	asymptomatisch										
ABU21 (B1)	nd	asymptomatisch										
ABU27 (B2)	nd	asymptomatisch										
ABU37 (B2)	nd	asymptomatisch										
ABU38 (B1)	nd	asymptomatisch										
ABU57 (A)	nd	asymptomatisch										
ABU62 (B1)	nd	asymptomatisch										
ABU63 (B2)	nd	asymptomatisch										
ABU64 (B2)	nd	asymptomatisch										
ABU83972 (B2)	nd	asymptomatisch										
U12587 (A)	O101:H-	chronische UTI										
B19062 (D)	O102:H6	chronische UTI										
B04058 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
B10490 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U12633 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U12740 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U15156 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U15451 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U15672 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U15762 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U17709 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U19010 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U19264 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U19310 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U23741 (B1)	O153:H31	chronische UTI										
U24421 (D)	O2:H42	chronische UTI										
S48 (D)	O1:K1	ExPEC										
S55 (A)	O16:K1	ExPEC										
S44 (B2)	O18:K1	ExPEC										
S49 (B2)	O18:K1	ExPEC										
S6 (B2)	O18:K1	ExPEC										
S39 (D)	O7:K1	ExPEC										
S87 (B2)	Ond:K1	ExPEC										
764 (B2)	O18:K1:H7	Fäkalisolat										
A152 (B2)	O7:K1:H5	Fäkalisolat										
A173 (D)	O18:K5:H5	Fäkalisolat										
RS218 (B2)	O18:K1:H-	Meningitis										
P42 (B2)	O1:K1:H7	Pyeloniphritis										
10413/93 (B2)	nd	Sepsis										
C25 (A)	nd	Sepsis										
39350 (B2)	O25	UTI										
177115 (B2)	O25	UTI										
F11 (B2)	nd	UTI										
RZ422 (B2)	O6:K14:H-	UTI										
RZ479 (B2)	O6:K14:H	UTI										
RZ505 (B2)	O6:K+:H31	UTI										
RZ532 (B2)	O6:K+:H-	UTI										

 korrekt positiv  korrekt negativ

Abbildung 3-19: Zusammenfassung der Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente der *fimH*-Varianten von 50 Blindproben nach Validierung mit den Resultaten der Sequenzierung. Der Übersichtlichkeit halber sind hier lediglich die Positionen aufgeführt, bei denen positive Ergebnisse erzielt wurden. Alle anderen Positionen wurden in allen Proben als korrekt-negativ identifiziert. Die Klassifizierung in die phylogenetischen Gruppen wurde nach der Methode von Clermont durchgeführt (Clermont et al. 2000).

Ergebnisse

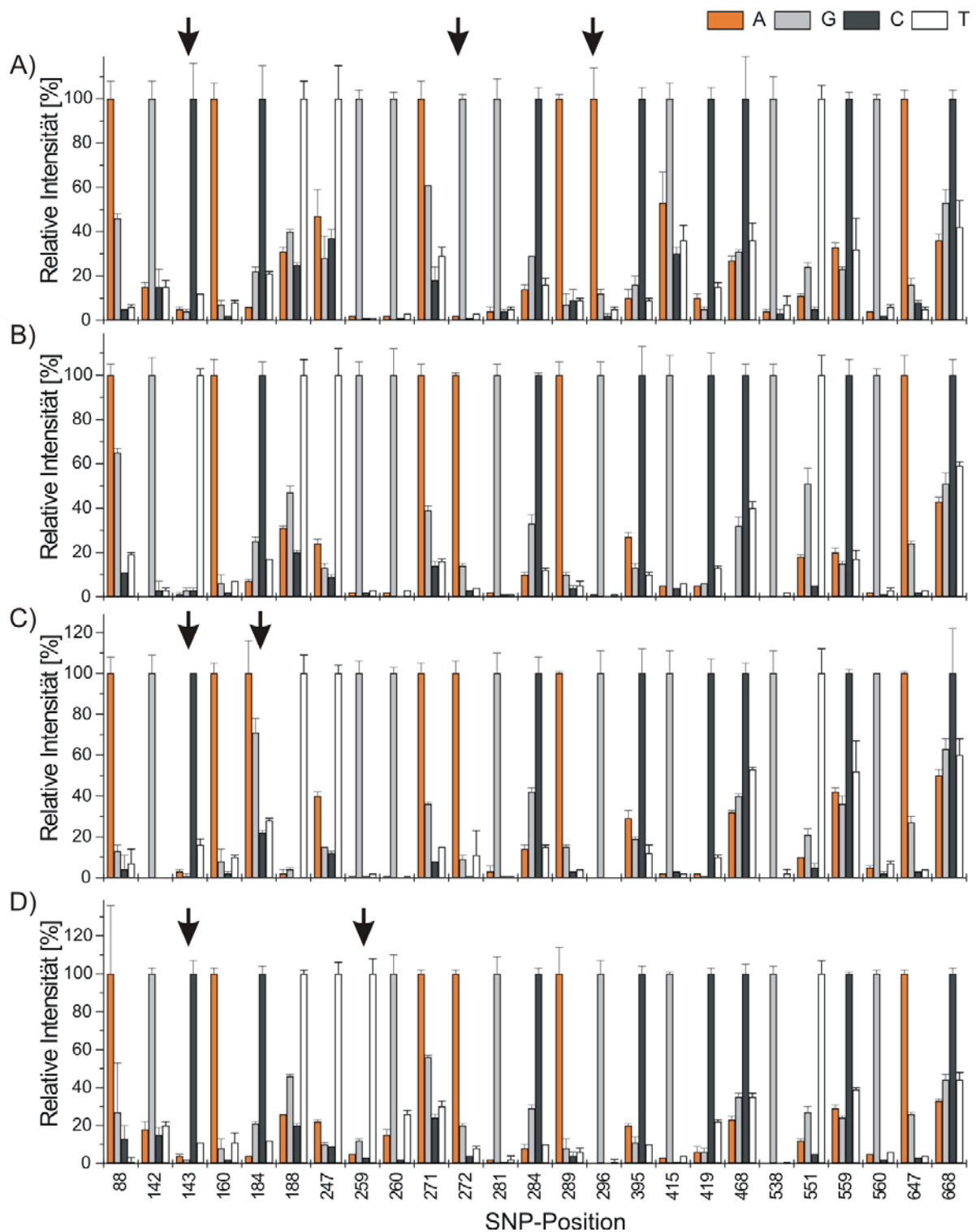


Abbildung 3-20: Relative Intensitäten von Experimenten mit den *fimH*-Varianten von A) ABU12 (Mutationen V27A, N70S und S78N), B) ABU38 (keine Mutation), C) U12633 (Mutationen V27A und Q41K) und D) S39 (Mutationen V27A und G66C). Die von der Referenzsequenz abweichenden Positionen sind mit einem Pfeil markiert.

einen repräsentativen Ausschnitt dieser Resultate wieder und zeigt die relativen Intensitäten aus vier Versuchen mit unterschiedlichen *fimH*-Varianten. In dem asymptomatischen Isolat ABU12 (B2) wurde durch den Nachweis der drei Mutationen 143 T→C, 272 A→G und 296 G→A die für B2-Stämme offensichtlich typische Dreifachmutation 27A / N70S / S78N gefunden. Das asymptomatische Isolat ABU38 (B1) zeigte im Vergleich zum Referenzstamm keine Veränderung in dem Hybridisierungsmuster. Das uropathogene Isolat U12633 (B1) wies die beiden Mutationen V27A / Q41K auf, die aus den beiden Nukleotidaustauschen 143 T→C und 272 C→T resultieren. Schließlich konnte in dem ExPEC Isolat S39 durch die beiden Mutationen 143 T→C und 259 G→T die Doppelmutation V27A / G66C detektiert werden.

3.2.2. Einfluss der Einbaurrate auf die Hybridisierung

Weitere grundlegende Untersuchungen wurden mit Ergebnissen durchgeführt, die an 20 in einem Ansatz parallel behandelten Isolaten erzielt wurden. Dabei wurden alle Arrays dieser Versuchsreihe nach der Hybridisierung mit PMT 55 eingescannt, was für die quantitative Aussage der folgenden Ergebnisse entscheidend war. Um den Einfluss der Einbaurrate zu bestimmen, wurden die durchschnittlichen Signale aller PMs von drei Isolaten (MG1655, P42 und B19062) ausgewertet, die keine stillen Mutationen in den Sondenbereichen aufwiesen. Nach der Aufreinigung der drei markierten PCR-Produkte wurden für diese folgende Einbauratensätze bestimmt: $E_{MG1655} = 68 \text{ nt/Cy3}$, $E_{B19062} = 62 \text{ nt/Cy3}$ und $E_{P42} = 104 \text{ nt/Cy3}$. In Abbildung 3-21 sind die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten aller PMs dieser drei Ansätze dargestellt, wobei die absolute Intensität des jeweiligen PMs von MG1655 als 100 % gesetzt und die Signale der Hybridisierungen P42 und B19062 daraufhin normiert wurden. Es wurde ersichtlich, dass die Intensitäten des Versuchs mit B19062, dessen *fimH*-Amplikon stärker fluoreszenzmarkiert war, etwas höhere absolute Signale ($103 \pm 13 \%$) lieferte, während die Hybridisierung mit P42 *fimH*, dessen Einbaurrate deutlich höher war, signifikant niedrigere Signale lieferte ($65 \pm 18 \%$).

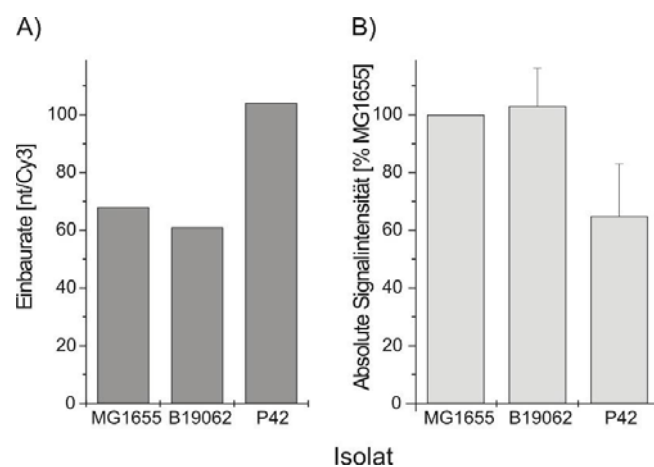


Abbildung 3-21: Einfluss der Einbaurrate auf die Signalstärke der PMs anhand von drei unabhängigen Versuchen, bei denen drei *fimH*-Varianten gewählt wurden, die keine stillen Mutationen in den jeweiligen Sondenbereichen besaßen. Dargestellt sind A) die Cy3-Einbauratensätze im jeweiligen *fimH*-Amplikon und B) die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der PMs, wobei die Intensitäten von MG1655 jeweils als 100 % normiert wurden.

Ergebnisse

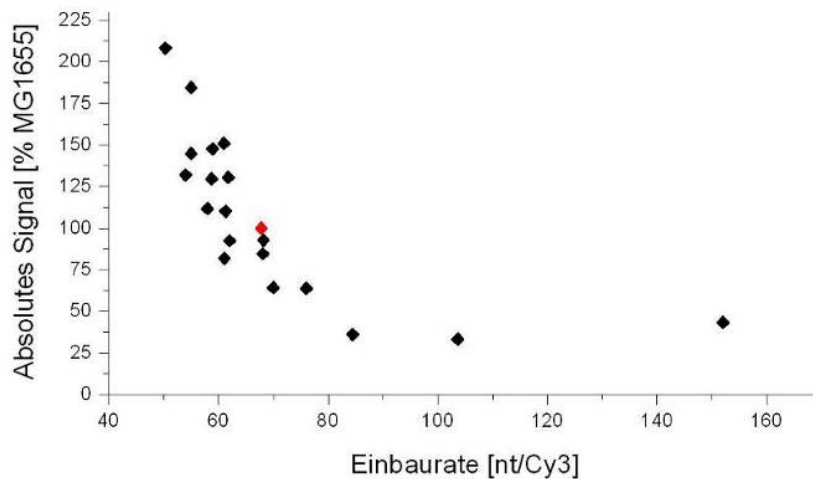


Abbildung 3-22: Abhängigkeit der absoluten Signalintensität von der Cy3-Einbaurrate anhand der Sonde 668C, die in allen Varianten als PM identifiziert wurde. Rot markiert ist der Wert des Fluoreszenzsignals des Referenzstammes MG1655 (E = 68), der als 100 % normiert wurde.

In einem weiteren Ansatz wurden alle Messwerte der Sonde 668C verglichen, die bei allen 20 Isolaten als PM identifiziert wurden. Zusätzlich konnte in keiner der *fimH*-Sequenzen eine stille Mutation in dem relevanten Sondenbereich um die Position 668 nachgewiesen werden. Durchschnittlich wurde eine Einbaurrate von $E = 69$ gemessen, wobei die Werte zwischen $E_{S49} = 50$ und $E_{S55} = 152$ variierten. Zur weiteren Auswertung wurde das absolute Fluoreszenzsignal der Sonde 668C von *E. coli* MG1655 gleich 100 % gesetzt und die Signale der Varianten daraufhin normiert. In Abbildung 3-22 ist die direkte Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Einbaurrate des Fluoreszenzfarbstoffs zu erkennen, wobei stärker markierte *fimH*-Varianten ($E < 60$) höhere Signale als der Referenzstamm MG1655 lieferten, und Varianten mit niedriger Einbaurrate ($E > 80$) signifikant schwächere absolute Signale zur Folge hatten. Dabei zeigten Varianten mit einer Einbaurrate von $E = 50$ bzw. 55 teilweise doppelt so starke Signale wie der Referenzversuch bzw. sechsmal so hohe Intensitäten wie das schwach markierte PCR-Produkt mit einer Einbaurrate von 152.

Die Sequenzierung der 20 *fimH*-Varianten ergab, dass keine der 20 Varianten in den relevanten Bereichen der SONDENSÄTZE 160, 284 und 668 eine stille Mutation aufwies. In Abbildung 3-23 sind alle relativen Intensitäten der jeweiligen SONDENSÄTZE in Abhängigkeit von den Signalintensitäten des jeweiligen PM und damit auch der Einbaurrate dargestellt. Für alle drei SONDENSÄTZE wurde deutlich, dass die unterschiedlichen Einbauratensätze (dargestellt in der Abszisse), die unterschiedlich hohe absolute Fluoreszenzsignale verursachten, keinen Einfluss auf die Diskriminierung hatten, da mit zunehmender Intensität keine abnehmenden oder zunehmenden relativen Intensitäten beobachtet werden konnten.

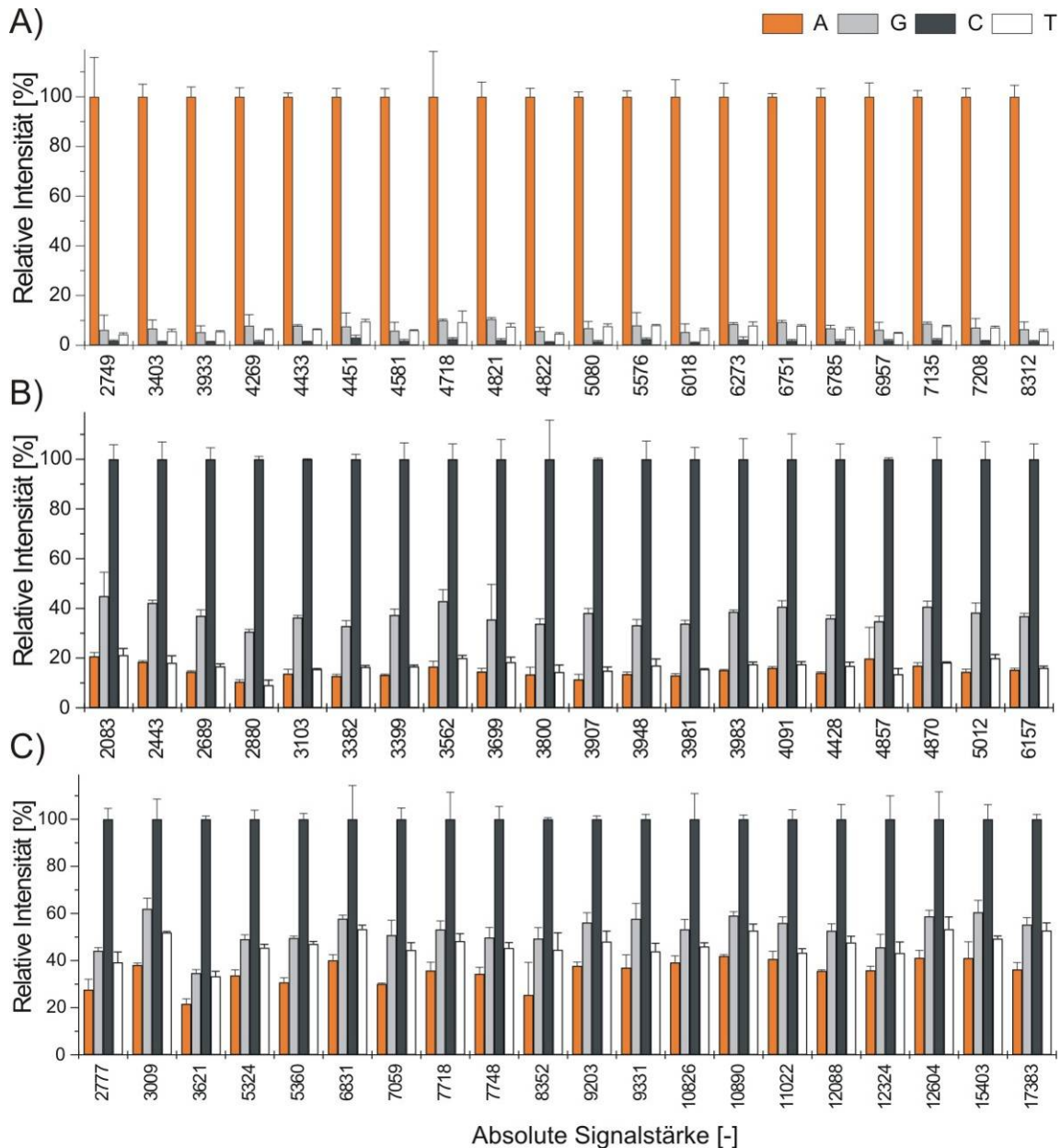


Abbildung 3-23: Relative Signalintensitäten der Sondensätze A) 160, B) 284 und C) 668 in Abhängigkeit von den absoluten Signalintensität des jeweiligen PMs und damit auch von der Einbaurate.

3.2.3. Robustheit der Diskriminierung zwischen allelspezifischen Sonden

Nicht nur eine möglichst konstante Diskriminierung der gleichen allelischen Variante in verschiedenen Experimenten ist für die Quantifizierung entscheidend, sondern auch eine möglichst gute Diskriminierung der verschiedenen Mutanten. So wurden für die Positionen 143, 184, 259, 272, 296 und 419, bei denen bei der Untersuchung der verblindeten Proben häufiger als bei anderen Sondensätzen eine Mutation identifiziert wurde, die jeweils maximalen RI_{MM} für Wildtyp und Mutante über zehn willkürlich gewählte Experimente verglichen (Abbildung 3-19).

Ergebnisse

Dabei wurden für die Positionen 143 (A) und 419 (F) keine signifikanten Änderungen der Diskriminierung bei den jeweiligen RI_{MM} der unterschiedlichen Mutationen beobachtet (für den Wildtyp 143T: $RI_{143G} = 14,9\%$; für die Mutante 143C: $RI_{143T} = 8,0\%$; für den Wildtyp 419C: $RI_{419T} = 18,7\%$; für die Mutante 143T: $RI_{419G} = 13,3\%$). Während für die Mutation 272G (D) im Vergleich zum Wildtyp eine leicht bessere Diskriminierung zwischen PM und MM ermittelt wurde (für den Wildtyp 272A: $RI_{272G} = 19,7\%$; für die Mutante 272G: $RI_{272A} = 2,9\%$), war bei der Position 296 (E) genau das Gegenteil der Fall (für den Wildtyp 296G: $RI_{296A} = 2,0\%$; für die Mutante 296A: $RI_{296G} = 11,5\%$). Im Sondensatz 184 (B) wurde dagegen eine signifikante Verschlechterung der Diskriminierung für die Mutante beobachtet (für den Wildtyp 184C: $RI_{184G} = 24,8\%$; für die Mutante 184A: $RI_{184G} = 63,3\%$). Für den Sondensatz 259 (C) konnten neben dem Wildtyp 259G zwei weitere Varianten identifiziert werden, wobei die Diskriminierung zwischen PM und MM unterschiedlich ausfällt: Während im Vergleich zu dem Wildtyp für die Mutante 259T nur ein leicht höheres Signal des maximalen PM festzustellen ist, wurde für die zweite Mutante 259A eine signifikante Verschlechterung beobachtet (für den Wildtyp 259G: $RI_{259T} = 1,8\%$; für die Mutante 259T: $RI_{259G} = 12,5\%$ und für die Mutante 259A: $RI_{259G} = 54,6\%$).

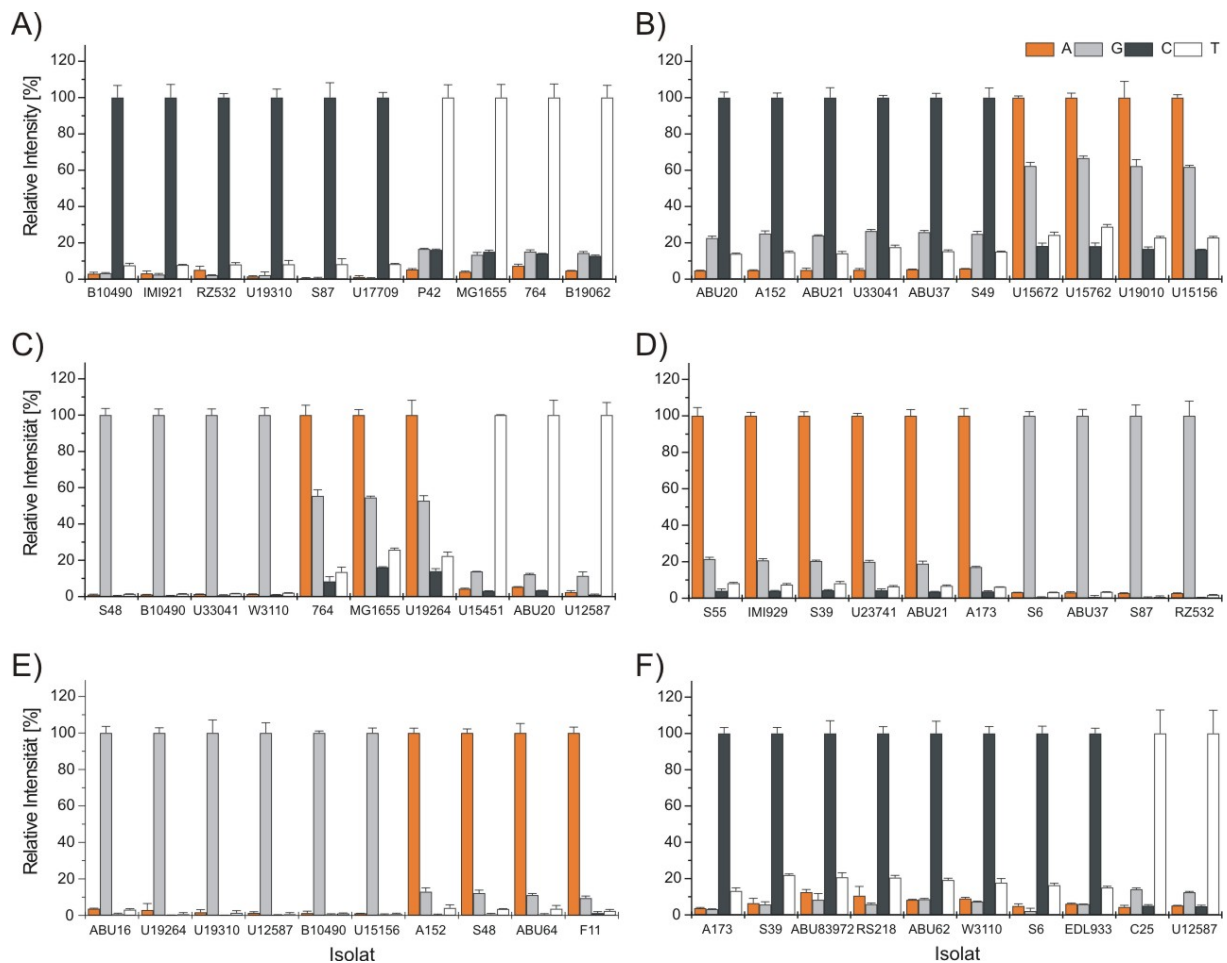


Abbildung 3-24: Relative Intensitäten der jeweiligen vier Sonden eines Sondensatzes der sechs Nukleotidpositionen A) 143, B) 184, C) 259, D) 272, E) 296 und F) 419 aus willkürlich ausgewählten Hybridisierungsexperimenten mit jeweils 10 *fimH*-Varianten.

3.2.4. Einfluss von stillen Mutationen auf die Hybridisierung

Bei der Analyse der bereits veröffentlichten *fimH*-Sequenzen wurden deutlich mehr stille Mutationen als Missensemutationen gefunden, die zu einem Austausch der Aminosäure und damit zu einem distinkten Phänotyp führen. Diese Variationen in der *fimH*-Sequenz wurden für das Sondendesign jedoch nicht berücksichtigt. Allerdings haben solche stillen Mutationen das Potential, die Signalintensität bei der Hybridisierung deutlich zu verringern. Zusätzlich können Missensemutationen an benachbarten Stellen auch Einfluss auf die Hybridisierung eines Sondensatzes einer anderen kritischen Position haben, wenn sie in dem relevanten Sondenbereich liegen. Deswegen wurde in der Versuchsreihe der 20 parallel untersuchten *fimH*-Varianten der Einfluss benachbarter Mutationen auf die absolute Signalstärke und auf die Diskriminierung zwischen PM und MM eines Sondensatzes untersucht. Dabei wurden jeweils die durchschnittlichen absoluten Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen PM, die auf das MG1655 Signal bezogen wurden, und die jeweiligen RI_{MM} miteinander verglichen (Abbildung 3-25).

Die hohen Standardabweichungen in den absoluten Intensitäten zeigten, dass innerhalb der absoluten Signale signifikante Intensitätsunterschiede existierten, die auf unterschiedliche Einbauraten zurückgeführt werden konnten. Je weiter eine zusätzliche Mutation von der kritischen Position entfernt lag, desto weniger wurde das absolute Signal verringert. So reduzierte die stille Mutation an Position 396 das Signal des PMs von Sondensatz 395 (C) um etwa 97 %. In diesem Fall war das absolute Fluoreszenzsignal von 600 Einheiten noch vom Hintergrund zu unterscheiden. Dagegen erniedrigte die Mutation 546 das Fluoreszenzsignal des PMs von Sondensatz 551 (G) um 85 % und die stille Mutation an Position 171 hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Fluoreszenzsignal des PMs von Sondensatz 184 (J). Dagegen hatten die benachbarten Mutationen in dem Bereich, der durch die Sonden abgedeckt wurde, nur teilweise Einfluss auf die Diskriminierung zwischen PM und MM. In den meisten Fällen wurden trotz der hohen Signalreduktionen vergleichbare, bzw. nicht signifikant unterschiedliche RI_{MM} erzielt. Ausnahmen dabei war die stille Mutation an Position 246, die die Diskriminierung für den Sondensatz 247 (E) signifikant verschlechterte (RI_{247A} : 21,8 % \rightarrow 69,8 %). Eine deutliche Verbesserung der RI_{MM} konnte für die Mutationen an den Positionen 184 (F; RI_{188G} : 43,4 % \rightarrow 5,8 %) und 546 (G; RI_{551G} : 60,2 % \rightarrow 21,3 %) beobachtet werden.

Im Bereich des Sondensatzes 538 wurden die beiden stillen Mutationen 534 und 546 gefunden, die auch in Kombination auftraten. Abbildung 3-26 zeigt, dass die weiter entfernte Mutation 546 größeren Einfluss auf die Signalstärke des PM 538G (Reduktion des Signals um 88,6 %) als die nur vier Nukleotide entfernte stille Mutation 534 (Reduktion um 69,6 %) hatte. Die Kombination von beiden stillen Mutationen erniedrigte das absolute Signal sogar um 98,5 %. Trotzdem war in allen Fällen eine eindeutige Identifizierung des PM bei gleichbleibender Diskriminierung möglich.

Ergebnisse

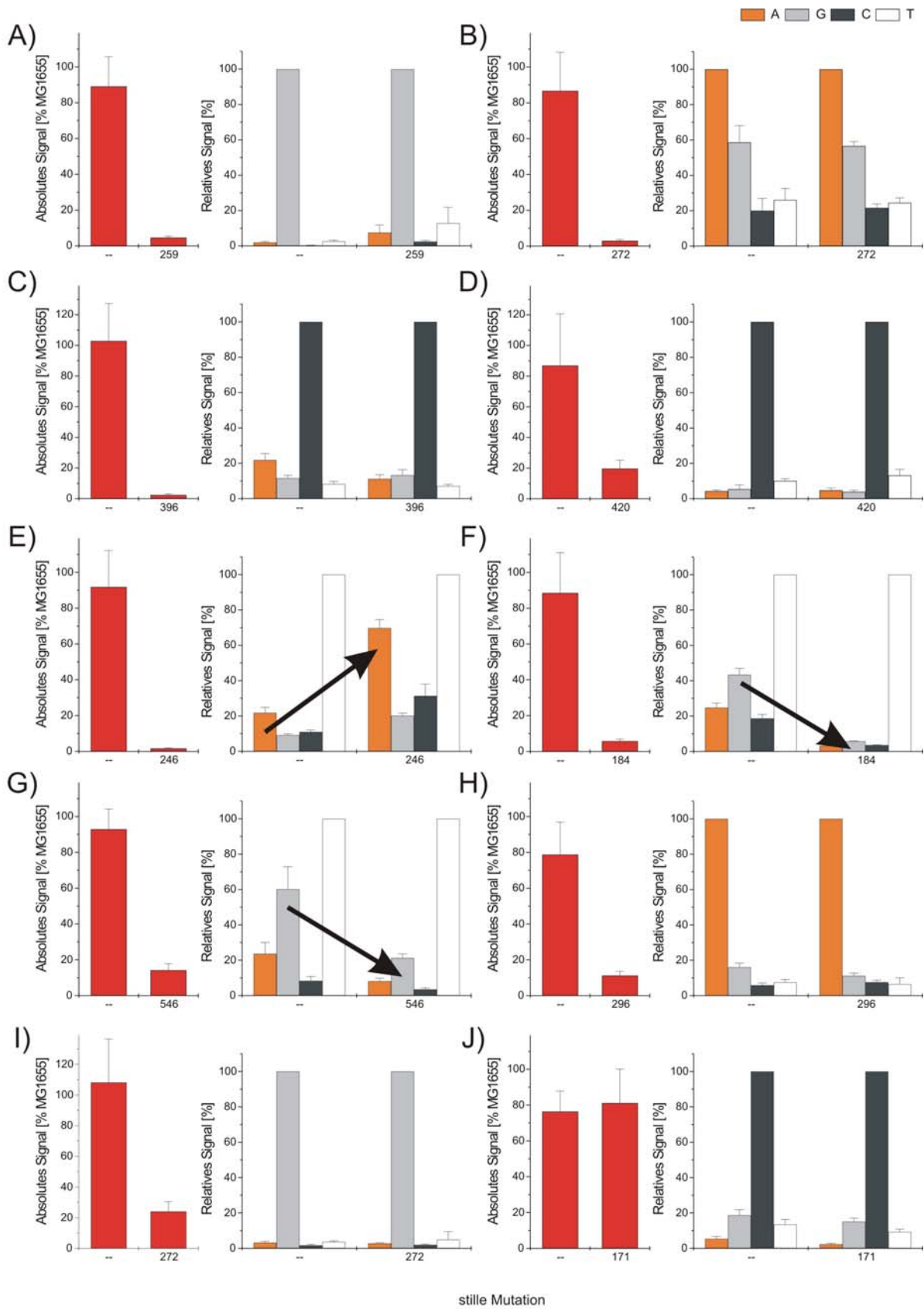


Abbildung 3-25: Einfluss von stillen Mutationen auf das absolute Fluoreszenzsignal des PMs und auf die Diskriminierung zwischen PM und MM. Aufgeführt sind der Einfluss der stillen Mutation A) 259 auf die Sonde 260, B) 272 auf Sonde 271, C) 396 auf Sonde 395, D) 420 auf Sonde 419, E) 246 auf Sonde 247, F) 184 auf Sonde 188, G) 546 auf Sonde 551, H) 296 auf Sonde 289, I) 272 auf Sonde 281 und J) 171 auf Sonde 184.

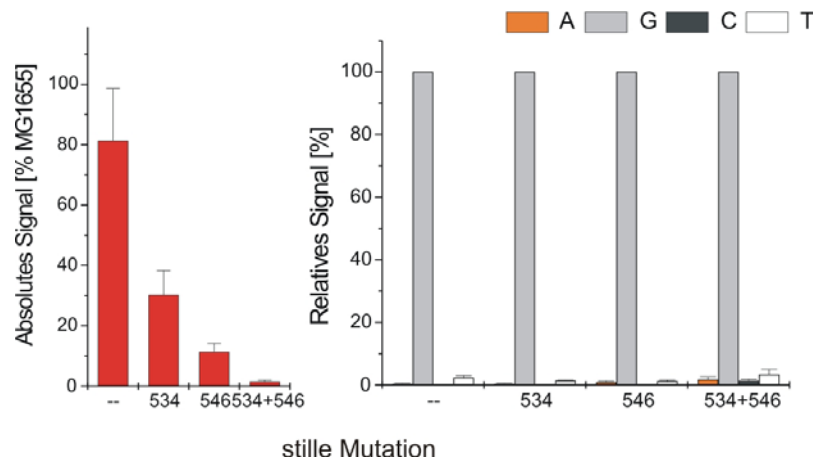


Abbildung 3-26: Einfluss der stillen Mutationen 534 und 546 auf das absolute Signal des PMs und die Diskriminierung des Sondensatzes 538.

3.2.5. Untersuchung der Spotmorphologie

Eine wichtige Rolle bei der Quantifizierung der Fluoreszenzsignale nimmt die Spotmorphologie ein. Dabei sind möglichst homogene Signale der einzelnen Pixel innerhalb eines Spots wünschenswert. Mit den fünf in Kapitel 2.6.3 beschriebenen Methoden wurden verschiedene Arten von Spotmorphologien (Abbildung 3-27) aus den unterschiedlichen Experimenten beschrieben. Ein eindeutiger Zusammenhang konnte zwischen dem Variationskoeffizienten der Spotpixel CV_{Spot} und einer visuellen Abschätzung der Spotqualität hergestellt werden. So wurden für vergleichsweise homogene Intensitätsverteilungen innerhalb eines Spots Werte zwischen 0,113 und 0,235 berechnet (A-F). Leichte Inhomogenitäten innerhalb eines Spots, die bis hin zu Andeutungen einer „Donut“-Form reichten, hatten dabei keine signifikanten Auswirkungen auf den CV_{Spot} -Wert (H-J). Erst eine offensichtlich deutliche Ausbildung eines „Donuts“ bzw. extrem inhomogene Spots, die auch auf Verunreinigungen zurückgeführt werden können, spiegelten sich in den hohen CV_{Spot} -Werten von 0,284 bis 0,688 wider (K-P).

Für die anderen vier Methoden konnte dagegen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den berechneten Parametern und einer visuellen und daher eher intuitiven Spotbeurteilung hergestellt werden. So betrug der Korrelationskoeffizient K zwischen Median- und arithmetischem Mittelwert für die meisten Spots $> 0,9$. Jedoch konnte für einen homogenen Spot wie im Fall I ein sehr niedriger K-Wert von 0,828 resultieren. Umgekehrt wurde für eine intuitiv schlechte Spotmorphologie wie im Fall O mit $K = 0,953$ ein sehr hoher Wert berechnet, der auf eine gute Morphologie schließen lassen würde. Ebenso konnte in den q-Werten kein Kriterium für eine sinnvolle Beschreibung der Spotmorphologie gefunden werden; dabei sollten möglichst hohe Werte für eine gute Spotqualität sprechen.

Somit wurde der CV_{Spot} -Wert als quantitatives Kriterium verwendet, um die einzelnen Spots eines Hybridisierungsexperimentes mit der *fimH*-Variante des Referenzstammes MG1655 zu bewerten. Dabei wurden alle Spots mit einem Anteil an gesättigten Pixeln von $> 10\%$ von der Beurteilung ausgenommen, wobei es sich

Ergebnisse

um die Signale der Spottingkontrolle und der positiven Hybridisierungskontrolle handelte. In Abbildung 3-28 sind die jeweiligen CV_{Spot} -Werte der einzelnen Spots aufgetragen. Im Mittel wurde ein CV_{Spot} von 0,298 berechnet, wobei 18 von 497 Spots einen Wert $> 0,4$ hatten. Dabei handelte es sich in 15 Fällen um leere Spots, also Stellen auf dem Array, an denen keine Sonde gedruckt wurde, oder um MM-Sonden, deren absolute Fluoreszenzsignale < 250 AE betragen und damit nicht

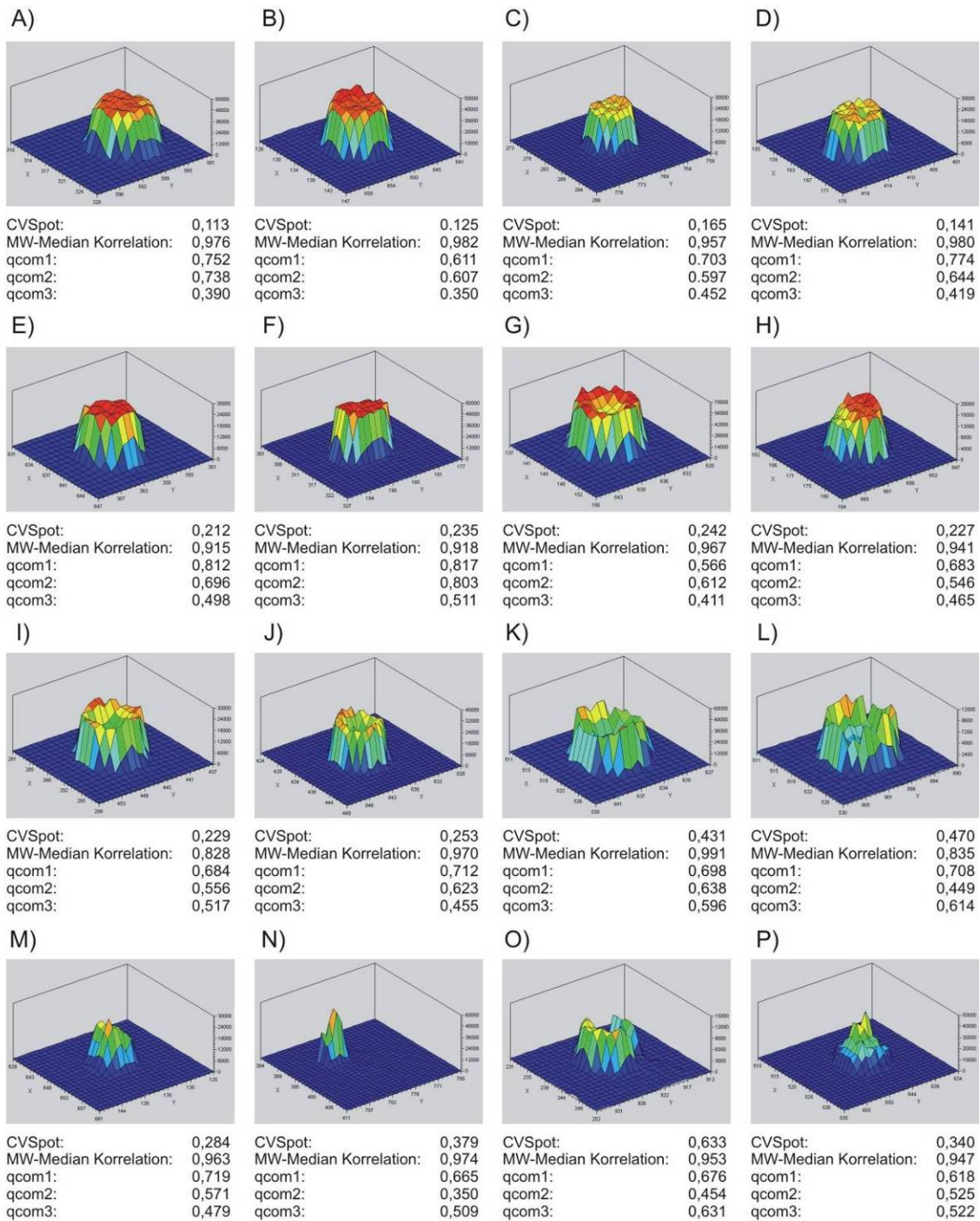


Abbildung 3-27: 3D-Darstellung von unterschiedlichen Spotmorphologien aus verschiedenen Hybridisierungsexperimenten mit dem *fimH*-Microarray. Dabei wurde in den Fällen A-F eine relativ homogene Morphologie, in den Spots G und H kleine Inhomogenitäten innerhalb des Spots, in den Fällen I bis L eine zunehmende Ausbildung von so genannten Donuts und schließlich in den Spots M bis P extrem inhomogene Signale beobachtet.

signifikant höher als die Hintergrundsignale waren. Für die Fälle A und B wurden deutlich inhomogene Spots mit absoluten Signalintensitäten von 637 AE bzw. 443 AE beobachtet. Der hohe Variationskoeffizient im Fall C von 0,986 wurde auf eine offensichtliche Verunreinigung innerhalb des Spots zurückgeführt, was in der 3D-Darstellung gezeigt wird. Anhand dieses Beispiels wurde verdeutlicht, dass der CV_{Spot} -Wert als potentieller Cut-off-Wert verwendet werden kann, um Datensätze automatisch von inhomogenen Spots zu bereinigen.

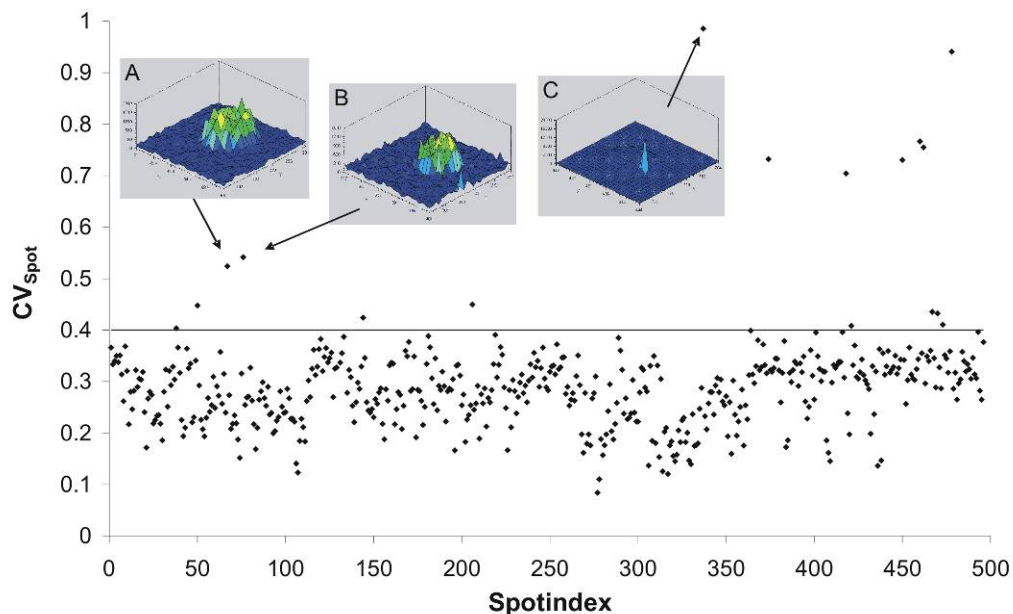


Abbildung 3-28: Darstellung der CV_{Spot} -Werte für die einzelnen Spots eines Hybridisierungsexperiments. Die drei Spots dieses Versuchs, deren absolute Fluoreszenzsignale deutlich größer als das Hintergrundsignal und deren CV_{Spot} -Wert größer als 0,4 waren, sind zusätzlich in 3D-Abbildungen dargestellt (A-C).

3.2.6. Mischpopulationen

Da in Realproben neben dem eigentlichen pathogenen Erreger noch weitere (oft asymptomatische) Isolate teilweise in sehr hohen Konzentrationen auftreten können, wurde das Signalverhalten der Sonden bei Mischungen untersucht. Dazu wurde die genomische DNA des asymptomatischen Isolats ABU38 mit der genomischen DNA des uropathogenen Isolates S6 im Verhältnis 100:1 bis zu 1:100 vor der Amplifizierung gemischt, um eine Realprobe zu simulieren. Dabei hatte das Isolat ABU38 keine FimH-Mutationen; das Isolat S6 trug die drei für pathogene B2-Stämme charakteristischen Mutationen V27A, N70S und S78N (siehe Abbildung 3-19). In Abbildung 3-29 sind die relativen Intensitäten der interessanten SONDENSÄTZE 143, 272 und 296 dargestellt. Dabei wurde offensichtlich, dass mit Hilfe des SONDENSÄTZE 143 Mischungen von 50:1 bis zu 1:100 aufgelöst werden konnten, da sich die RI_{MM} in diesen Fällen noch von den relativen Intensitäten, die in den Reinkulturen erzielt wurden (1:0 bzw. 0:1), unterschieden. Mit zunehmendem Anteil des S6-Isolats steigen die Werte von $RI_{143\text{C}}$, $RI_{272\text{G}}$ und $RI_{296\text{A}}$ im Vergleich zu dem jeweiligen PM an, wobei je nach SONDENSÄTZE und den jeweiligen thermodynamischen

Ergebnisse

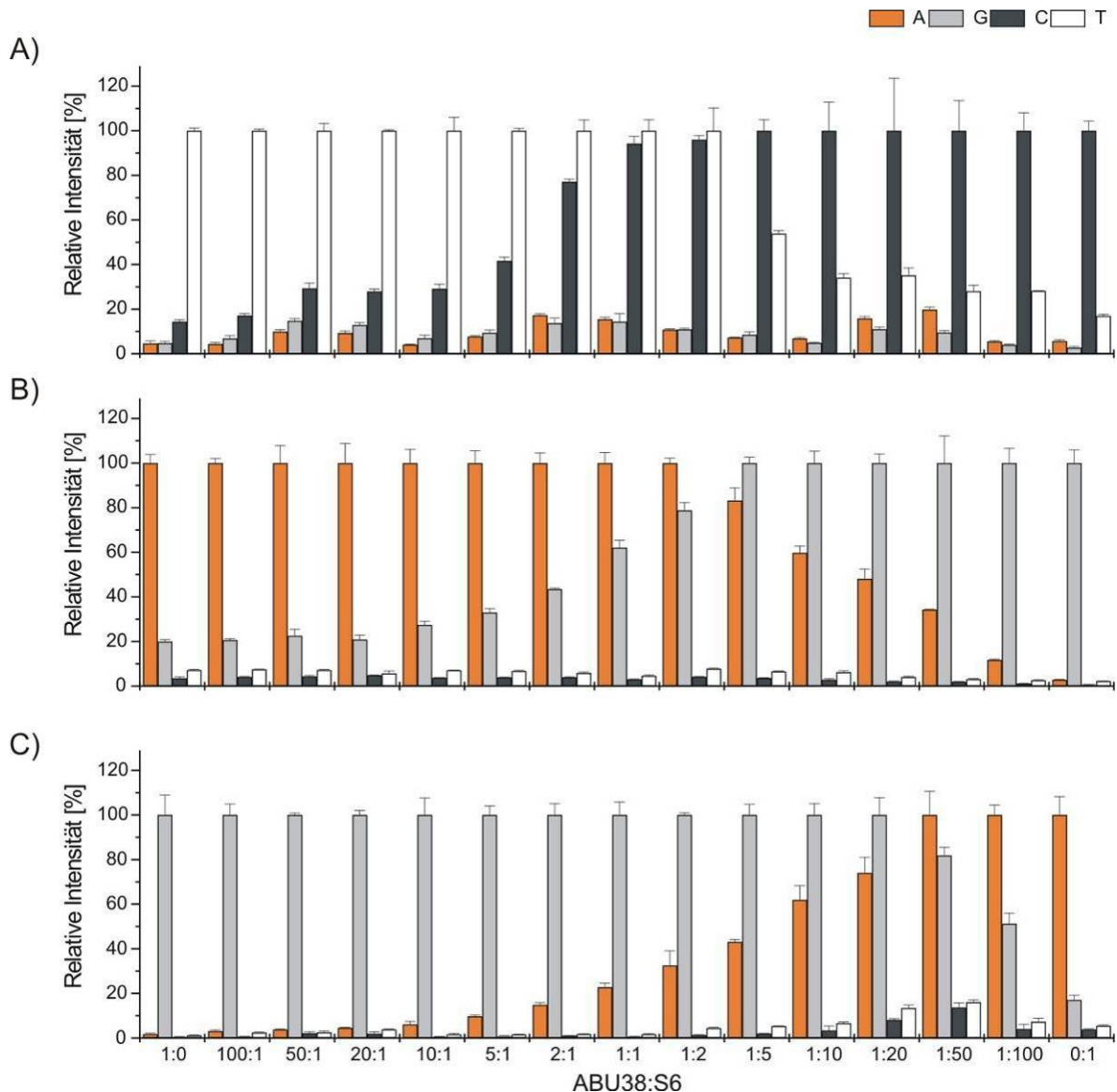


Abbildung 3-29: Relative Intensitäten der Hybridisierungsexperimente mit Mischungen von genomischer DNA des asymptotischen Isolats *E. coli* ABU38, das keine Mutation trägt, und des uropathogenen Isolats *E. coli* S6, das die drei Mutationen V27A, N70S und S78N trägt. Dargestellt sind die jeweiligen relativen Intensitäten der drei relevanten Sondensätze 143 (A), 272 (B) und 296 (C).

Parametern der Umbruch erfolgt, bei dem die Mutante als PM identifiziert wurde. Im Fall der Sondensätze 143 (A) und 272 (B) konnte dies zwischen 1:2 und 1:5, für den Sondensatz 296 erst zwischen 1:20 und 1:50 beobachtet werden. Dieser Unterschied wurde auf die relativ niedrigen Schmelztemperaturen der vier Sonden der Position 296 (C) zurückgeführt, die bei den sehr stringenten Hybridisierungsbedingungen sogar unter der eingestellten Hybridisierungstemperatur lagen. So betrug die Schmelztemperatur der Sonde, die komplementär zum Wildtyp ist, $T_{m,296G} = 48,4 \text{ }^\circ\text{C}$, während die Sonde, die die Mutante nachweist, eine Schmelztemperatur von $T_{m,296A} = 46,6 \text{ }^\circ\text{C}$ aufwies. Obwohl die Mischungen offensichtlich nicht quantitativ wiedergespiegelt wurden, war der Array aber prinzipiell in der Lage, Mischungen zweier Stämme mit unterschiedlichen FimH-Mutationsmustern im kleinen Umfang aufzulösen.

3.2.7. Untersuchung der ECOR-Sammlung

Um eine systematische Untersuchung der *fimH*-Diversität in der Vielfalt von *E. coli* durchzuführen, wurden mit dem *fimH*-Microarray zusätzlich die *fimH*-Varianten der 72 *E. coli*-Stämme aus der ECOR-Sammlung (Ochman und Selander 1984) untersucht, die als Referenzstämme die ganze Breite von *E. coli* repräsentieren. Zusätzlich wurden alle *fimH*-PCR-Produkte sequenziert und miteinander verglichen. Die Analyse der PCR-Produkte mit Gelelektrophorese zeigte, dass 69 der 72

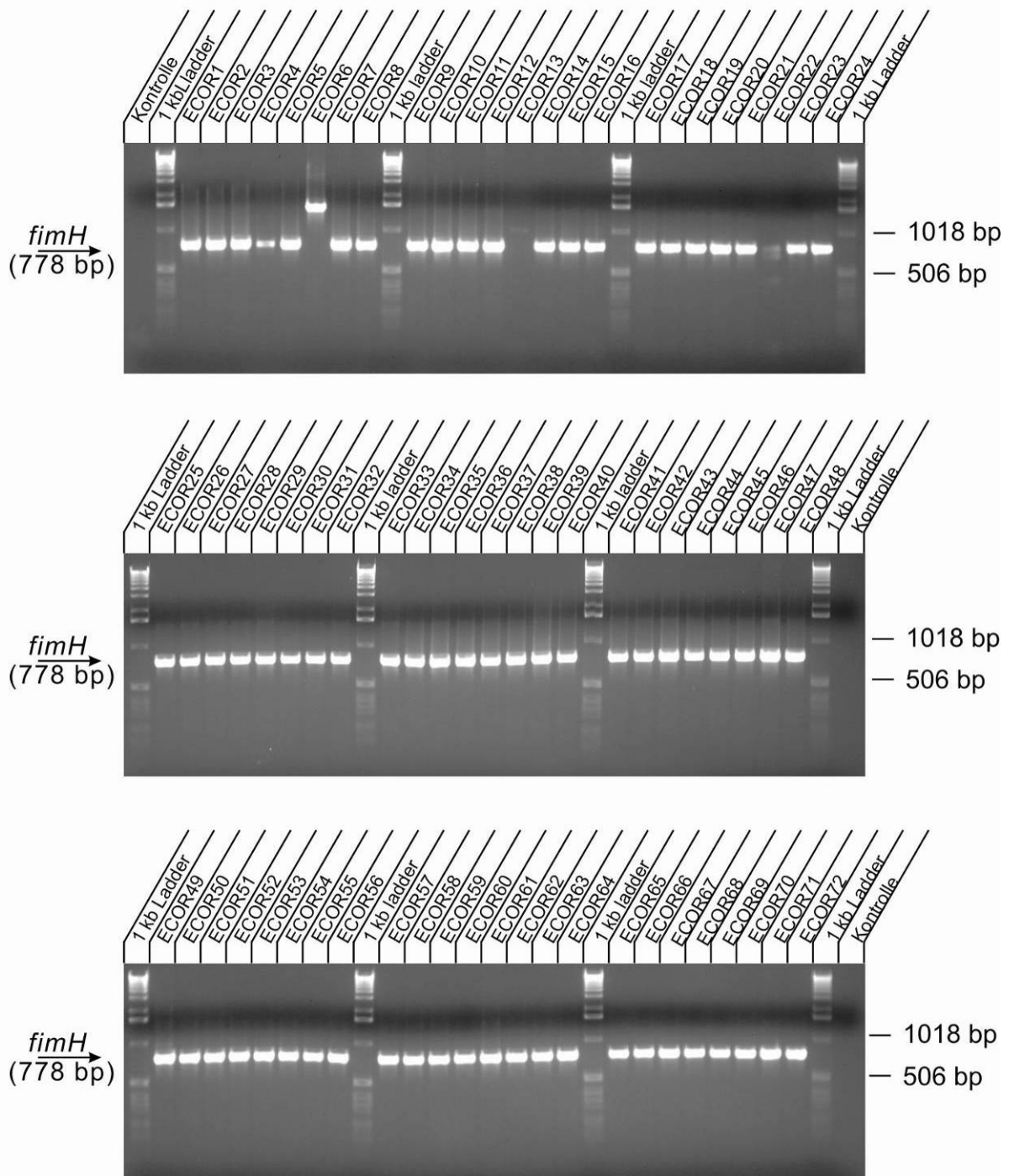


Abbildung 3-30: Agarosegele zur Kontrolle der Amplifizierung der *fimH*-Varianten in den 72 Stämmen der ECOR-Sammlung

Ergebnisse

```
1-AGGGCTGGTC GGTAAATGCC TGGTCATTCG CCTGTAAAAAC CGCCAATGGT
51-ACCGCTATCC CTATTGGCGG TGGCAGCGCC AATGTTTATG TAAACCTTGC
101-GCCCGCCGTG AATGTGGGGC AAAACCTGGT CGTGGGTGAT GCTGCCAACT
151-TACTGATTTA GTGTATGATG GTGTTTTTTA GGTGCTCCAG TGGCTTCTGT
201-TTCTATCAGC TGTCCCTCCT GTTCAGCTAC TGACGGGGTG GTGCGTAACG
251-GCAAAAGCAC CGCCGGACAT CAGCGCTATC TCTGCTCTCA CTGCCGTAAA
301-ACATGGCAAC TGCAGTTCAC TTACACCGCT TCTCAACCCG GTACGCACCA
351-GAAAATCATT GATATGGCCA TGAATGGCGT TGGATGCCGG GCAACTGCCC
401-GCATTATGGG CGTTGGCCTC AACACGATTT TACGTCACTT AAAAACTCA
451-GGCCGCAGTC GGTAACTTCG CGCATAACAG CGGGCAGTGA CGTCATCGTC
501-TGCGCGGAAA TGGACGAACA GTGGGGCTAT GTCGGGGCTA AATCGCGCCA
551-GCGCTGGCTG TTTTACGCGT ATGACAGTCT CCGGAAGACG GTTGTTCGCG
601-ACGTATTCCG TGAACGCACT ATGGCGACGC TGGGGCGTCT TATGAGCCTG
651-CTGTCAACCT TTGACGTGGT GATATGGATG ACGGATGGCT GGCCGCTGTA
701-TGAATCCCGC CTGAAGGGAA AGCTGCACGT AATCAGCAAG CGATATACGC
751-AGCGAATTGA GCGGCATAAC CTGAATCTGA GGCAGCACCT GGCACGGCTG
801-GGACGGAAGT CGCTGTCTGT CTCAAAATCG GTGGAGCTGC ATGACAAAGT
851-CATCGGGCAT TATCTGAACA TAAAACACTA TCAATAAGTT GGAGTCATTA
901-CTTGGTCGTG GATCTTTCGA CGCAAATCTT TTGCCATAAC GATTATCCGG
951-AAACCATTAC AGACTATGTC ACACTGCAAC GAGGCTCGGC TTATGGCGGC
1001-GTGTTATCTA ATTTTTCCGG GACCGTAAAA TATAGTGGCA GTAGCTATCC
1051-ATTTCTTACC ACCAGCGAAA CGCCGCGCGT TGTTTATAAT TCGAGAACGG
1101-ATAAGCCGTG GCCGGTGGCG CTTTATTTGA CGCCTGTGAG CAGTGCGGGC
1151-GGGGTGGCGA TTAAAGCTGG CTCATTAATT GCCGTGCTTA TTTTGCGACA
1201-GACCAACAAC TATAACAGCG ATGATTTTCA GTTTGTGTGG AATATTTACG
1251-CCAATAATGA TGTGGTGGTG CCTACTGGCG GCTGCGATGT TTCTGCTCGT
1301-GATGTCACCG TTA
```

Abbildung 3-31: Sequenz der ECOR6 *fimH*-Variante mit dem integrierten IS1-Transposon (Nukleotide 135 bis 902), das rot markiert ist. Die *terminal repeat* (135 bis 157) und *inverted terminal repeat* Sequenzen (880 bis 902) sind kursiv hervorgehoben.

Stämme (entspricht 95,8%) ein *fimH*-Produkt mit einer korrekten Größe von 778 bp aufwiesen (Abbildung 3-30). Während ECOR13 und ECOR22 *fimH*-negativ waren, besaß ECOR6 eine schätzungsweise 1500 bp große *fimH*-Variante. Im Zuge der Sequenzierungen wurde diese Variante in Blastn auf homologe Sequenzen untersucht. Dadurch konnte die Größe des Fragments auf die Integration eines IS1-Transposons zurückgeführt werden. In Abbildung 3-31 ist diese Sequenz dargestellt. Die Basen 1-134 wurden dabei als *fimH*-Sequenz, die Basen 135 bis 902 als IS1-Transposonsequenz und die Basen 903 bis 1469 wiederum als *fimH*-Sequenz identifiziert. Dabei besaß das 768 Basenpaare große Transposon am 5'- und am 3'-Ende eine so genannte terminal repeat-Sequenz (Basen 135 bis 157) bzw. eine inverted terminal repeat-Sequenz (Basen 880 bis 902), die für die Integration dieses Elements essentiell sind.

Zusätzlich wurde durch Sequenzierung die Mutation E117K in der *fimH*-Variante von ECOR11 identifiziert, die für das Sondendesign nicht berücksichtigt wurde. Außerdem wurde eine weitere, bisher nicht publizierte Mutation V163I in ECOR49 gefunden.

Die markierten *fimH*-Produkte der 70 *fimH*-positiven ECOR-Stämme wurden durch Hybridisierung mit dem *fimH*-Microarray untersucht. Die Zusammenfassung aller Ergebnisse der Hybridisierungen im Vergleich mit den Sequenzierungen ist in Abbildung 3-32 dargestellt, wobei die ECOR-Stämme nach Herzer (Herzer et al. 1990) in die phylogenetische Gruppen A, B1, B2, D und E eingeteilt wurden. Insgesamt konnten durch die Hybridisierung zwölf verschiedene Mutationen in den ECOR-Stämmen identifiziert werden, von denen vier in dieser Arbeit noch nicht validiert werden konnten: V27T (in ECOR52), R166H (in ECOR56), Y195F (in ECOR05) und A202V (in ECOR06, ECOR07, ECOR10, ECOR17, ECOR20, ECOR21 und ECOR25). Die Mutation V27T in ECOR52 wurde aus der Kombination der Mutationen V27A (143 T→A) und V27T (142 G→A) identifiziert.

Unter den 23 *fimH*-positiven ECOR A-Stämmen wiesen fünf Stämme keinen Aminosäureaustausch auf, vier Stämme hatten die einzelne Mutation V27A, sechs Stämme das Mutationsmuster V27A/A119V, ein Stamm die Kombination V27A/Y195F, fünf Stämme das Muster V27A/A202V und schließlich zwei Stämme die Dreifachmutation V27A/G66S/A202V. Unter den 16 B1-Stämmen befanden sich ein Stamm mit keiner Mutation, zwölf Stämme mit einer einzelnen Mutation V27A und drei Stämme mit der Kombination V27A/A119V. In der B2-Gruppe aus 15 Stämmen waren fünf ohne Mutation, ein Stamm mit der Kombination V27A/R166H, ein Stamm mit der Mutation V27A/S78N, ein Stamm mit der Dreifachmutation V27T/N70S/S78N, zwei Stämme mit der Dreifachmutation V27A/N70S/S78N, drei Stämme mit der Kombination V27A/N70S/S78N/G66S und jeweils ein Stamm mit der Kombination V27A/N70S/S78N/T74I bzw. V27A/N70S/S78N/V163A. Die zwölf Stämme umfassende Gruppe D setzte sich aus sieben Stämmen mit der einzelnen Mutation V27A, vier Stämmen mit der Doppelmutation V27A/G66C und einem Stamm mit der Kombination V27A/A119V zusammen. Schließlich befanden sich in der kleinen Gruppe E drei Stämme mit der einzelnen Mutation V27A, der vierte Stamm besaß keine Mutation. Insgesamt wurden für die Hybridisierungen ein durchschnittlicher mRI von $16,8 \pm 1,9$ % berechnet, was mit den Ergebnissen der Blindproben vergleichbar ist, wobei wiederum keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse beobachtet werden konnten.

3.2.8. *fimH*-Sequenzalignment

Um nicht nur das Auftreten der Mutationen in den Stämmen zu beschreiben, sondern auch die Verwandtschaft der unterschiedlichen *fimH*-Varianten speziell im Hinblick auf eine phylogenetische Gruppierung zu untersuchen, wurde der Sequenzabschnitt 76 bis 707 aller 130 *fimH*-Varianten über ein Alignment verglichen und in einem phylogenetischer Baum (Abbildung 3-33) in verschiedene Cluster eingeteilt.

Die Stämme, in denen durch Hybridisierung keine Mutationen identifiziert werden konnten, wurden dabei in die beiden verschiedenen Clustern 'keine Mutation I' und 'keine Mutation II' eingeteilt. Diese beiden Gruppen sind auf acht stille Mutationen im zweiten Cluster an den Positionen 105, 117, 141, 171, 318, 339, 714 und 717 zurück zu führen; in beiden Clustern konnte allerdings keine eindeutige Zuordnung zu einer phylogenetischen Gruppe erfolgen. Varianten mit der einzigen Mutation V27A waren

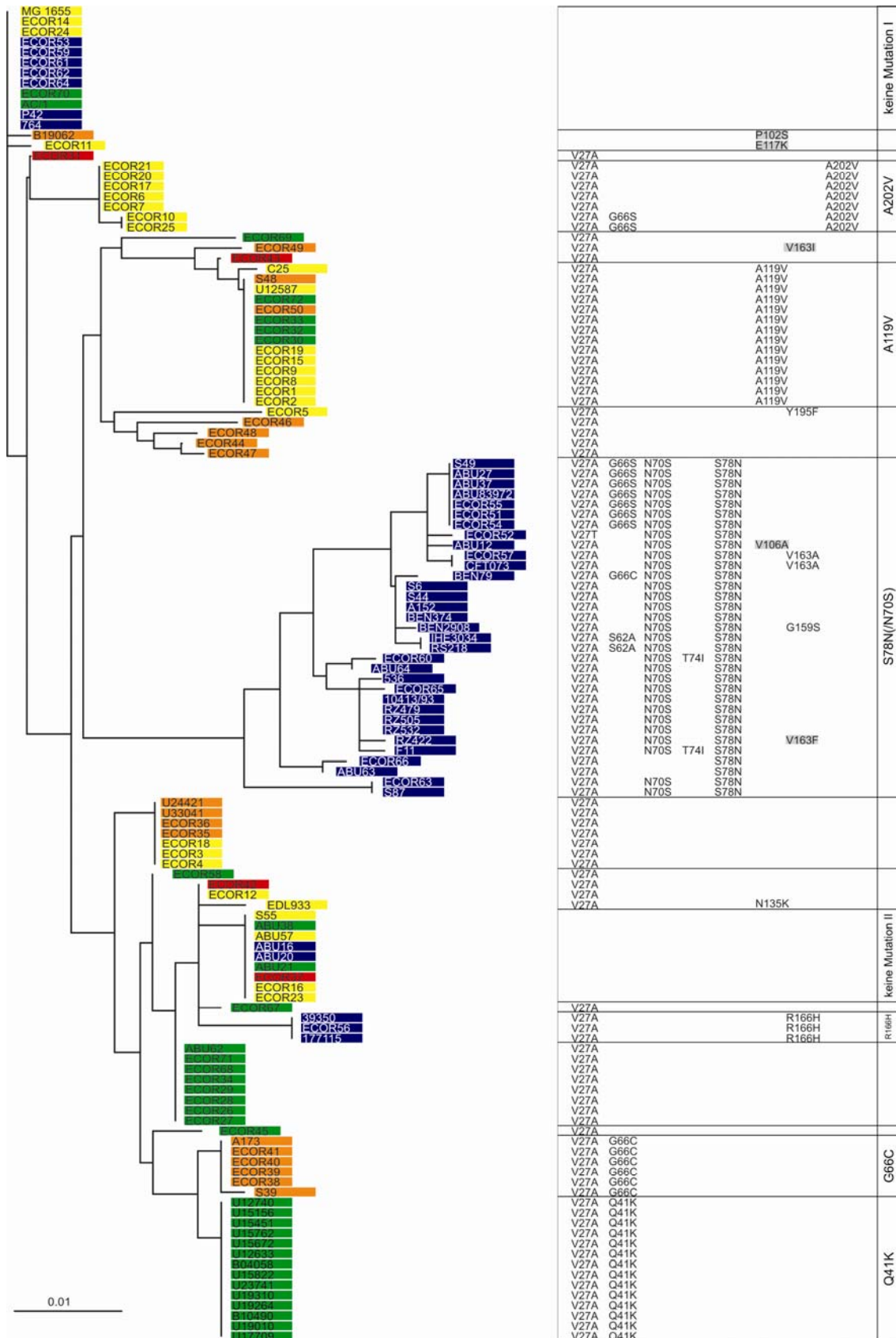


Abbildung 3-33: Phylogenetischer Baum und Zuweisung der durch Hybridisierung identifizierten Mutationen nach einem Vergleich der Sequenzbereiche 76 bis 707 der 130 *fimH*-Varianten. Die Einteilung in die verschiedenen Gruppen erfolgte für die ECOR-Stämme nach Herzer (Herzer et al. 1990) und für die Blindproben nach Clermont (Clermont et al. 2000). Dabei sind Stämme der Gruppe A in gelb, der Gruppe B1 grün, der Gruppe B2 blau, der Gruppe D orange und der Gruppe E rot markiert. Die fünf grau markierten Mutationen wurden durch Sequenzierung identifiziert.

über das gesamte Alignment verteilt und konnten ebenso keiner Gruppe zugeordnet werden. In dem Cluster `A202V` befanden sich ausschließlich Varianten der Gruppe A, die sich durch die Mutation A202V, auch in Kombination mit der Mutation G66S, auszeichneten; bei A202V handelte es sich offensichtlich um eine spezifische Mutation für Gruppe A. In dem Cluster `A119V` wurden *fimH*-Varianten aus Stämmen unterschiedlicher Gruppen gefunden. Darunter befanden sich allerdings keine Stämme aus der Gruppe B2. Der Cluster `G66C` setzte sich ausschließlich aus Stämmen der Gruppe D zusammen, die die Mutationskombination V27A / G66C trugen. Die 14 Stämme mit dem Serotyp O153:H31 bildete den damit nahe verwandten Cluster `Q41K`. Interessanterweise konnte in erster Linie für B2-Stämme eine eindeutige Zuweisung erfolgen. Während sich drei Varianten im Cluster `R166H` befanden, waren ein Großteil der B2-Stämme im distinkten Cluster S78N / (N70S), wobei fast alle der Stämme mindestens die Dreifachmutation V27A / N70S / S78N aufwiesen. Lediglich die *fimH*-Varianten von ECOR66 und des Isolates ABU63 hatten in der Position 70 keine Mutation; damit handelte es sich bei S78N und N70S um B2-spezifische Mutationen. Zusätzlich erwähnenswert ist die Tatsache, dass einzelne Mutationen, die durch den Microarray abgedeckt sind (bspw. S62A, T74I, G159S oder V163A), ebenso wie die durch Sequenzierung neu gefundenen fünf Mutationen offensichtlich keinen Einfluss auf die Phylogenie hatten; ihr seltenes Auftreten ließ keine Aussage über ein spezifisches Auftreten in einer bestimmten Gruppe zu.

3.2.9. Sequenzanalyse der *fimH*-Varianten

Die 130 *fimH*-Sequenzen wurden im Vergleich zu der Referenzsequenz des *E. coli*-Stammes MG1655 bezüglich möglicher Sequenzunterschiede untersucht, um die Qualität der Daten, die für das Sondendesign verwendet wurden, und damit auch die Abdeckung der für diesen Array berücksichtigten Positionen abschätzen zu können. Dabei wurden die für das Alignment verwendeten Abschnitte zwischen den Nukleotiden 76 und 707 verwendet. Der Vergleich dieser Analyse mit der Sequenzuntersuchung für das Sondendesign aus 3.1.1 ist in Abbildung 3-34 dargestellt. Insgesamt konnten in den *fimH*-Varianten der 130 *fimH*-positiven Proben 64 polymorphe Positionen identifiziert werden, wobei es sich dabei um 45 stille Mutationen und 19 Missensemutationen handelte, die zu einem Austausch der Aminosäure führten. An zwei Positionen wurden unterschiedliche Polymorphismen gefunden: 259 G → A bzw. T und 550 G → T bzw. A; diese resultierten in den Mutationen G66C/S und V163F/I.

Zusammenfassend wurden vier der 19 polymorphen Positionen nicht für das Sondendesign berücksichtigt, wobei lediglich eine Position bereits bei der Sequenzanalyse identifiziert wurde (Nukleotid 412 G → A resultiert in E117K). Die anderen drei Mutationen (367, 380 und 550) wurden während der Analyse der öffentlich zugänglichen bzw. in unterschiedlichen Veröffentlichungen publizierten Sequenzen nicht als polymorph identifiziert. An der Position 225C, für die in der ersten Sequenzanalyse (3.1.1) neben der stillen Mutation 225T auch ein Polymorphismus zu 225G gefunden wurde, der in der Mutation N54E resultierte, wurde in den untersuchten Varianten mehrmals lediglich die stille Mutation 255T gefunden.

1	ATGAAACGAG	TTATTACCCT	GTTTGCTGTA	CTGCTGATGG	GCTGGTCGGT
	ATGAAACGAG	TTATTACCCT	GTT <u>T</u> GCT <u>G</u> T <u>A</u>	CTGCTGATGG	GCTGGTCGGT
51	AAATGCCTGG	TCATTGCGCT	GTAAAACCGC	CAATGGTACC	GCTATCCCTA
	AAA <u>T</u> GCCTGG	T <u>C</u> ATTGCGCT	GTAAAACCG <u>C</u>	CAATGGT <u>A</u> CC	GCTATCCCTA
101	TTGGCGGTGG	CAGCGCAAT	GTTTATGTAA	ACCTTGCGCC	<u>C</u> GTCGTGAAT
	TTGG <u>C</u> GGTGG	CAGCGC <u>A</u> AT	GTTTATGTAA	ACCTTGCGCC	<u>C</u> GTCGTGAAT
151	GTGGGGCAA <u>A</u>	ACCTGGTCGT	<u>G</u> GATCTTTTCG	ACG <u>C</u> AAATCT	TTTGCCATAA
	GTGGGGCAA <u>A</u>	A <u>C</u> CTGGTCGT	<u>G</u> GATCTTTTCG	ACG <u>C</u> AAAT <u>T</u> CT	TTT <u>G</u> CCATAA
201	CGATTATCCG	GAAACCATTA	CAGACATATGT	CACACTGCAA	CGAGGCTCGG
	CGATTATCCG	GAAACCATTA	CAGACATATGT	CACACTGCAA	CGAGGCTCGG
251	CTTATGGC <u>C</u> G	CGTGTATCT	<u>A</u> ATTTTTCCG	<u>G</u> GACCGTAAA	ATATAGTGGC
	CTTATGGC <u>C</u> G	CGTGTATCT	<u>A</u> ATTTTTCCG	<u>G</u> GACCGTAAA	ATATAGTGGC
301	AGTAGCTATC	<u>C</u> ATTTCCTAC	<u>C</u> ACCAGCGAA	ACGCCGCGC	TTGTTTATAA
	AGTAGCTATC	<u>C</u> ATTTCCTAC	<u>C</u> ACCAGCGAA	ACGCCGCGC	TTGTTTATAA
351	TTCGAGAACG	GATAAG <u>C</u> CGT	GGCCGGTGG <u>C</u>	GCTTTATTTG	ACGCC <u>T</u> GTGA
	TTCGAGAACG	GATAAGCCGT	GGCCGGTGGC	GCTTTATTTG	ACGCC <u>T</u> GTGA
401	GCAGTGC <u>G</u> GG	<u>C</u> GGGGTGG <u>C</u> G	ATTAAAGCTG	GCTCATTAAAT	TGCCGTGCTT
	GCAGTGC <u>G</u> GG	<u>C</u> GGGGTGG <u>C</u> G	ATTAAAGCTG	GCTCATTAAAT	TGCCGTGCTT
451	ATTTTGCAGC	AGAC <u>C</u> AA <u>C</u> AA	CTATAACAGC	GATGATTTCC	AGTTTGTGTG
	ATTTTGCAGC	AGAC <u>C</u> AA <u>C</u> AA	CTATAACAGC	GATGATTTCC	AGTTTGTGTG
501	GAATATTTAC	GCCAATAATG	ATGTGGT <u>G</u> GT	GCCTACT <u>G</u> GC	GGCTG <u>C</u> GAT <u>G</u>
	GAATATTTAC	GCCAATAATG	ATGTGGT <u>G</u> GT	GCCTACT <u>G</u> GC	GGCTG <u>C</u> GATG
551	<u>T</u> TTCTGCT <u>C</u> G	TGATGTCACC	GTTACTCTGC	CGGACTACCC	TGGTTCAGTG
	<u>T</u> TTCTGCT <u>C</u> G	TGATGTCACC	GTTACTCTGC	CGGACTACCC	TGGTTCAGTG
601	CCAATTCCTC	TTACCGTTTA	TTGTGCGAAA	AGCCAAAACC	TGGGGT <u>A</u> TTA
	CCAATTCCTC	TTACCGTTTA	TTGTGCGAAA	AGCCAAAACC	TGGGGT <u>A</u> TTA
651	CCTC <u>T</u> CCGGC	ACAACCG <u>C</u> AG	ATGCGGGCAA	CTC <u>G</u> ATTTTC	ACCAATACCG
	CCTC <u>T</u> CCGGC	ACA <u>A</u> CCG <u>C</u> AG	ATG <u>C</u> GGGCAA	CTC <u>G</u> ATTTTC	ACCAATACCG
701	<u>C</u> GTCGTTTTC	ACCTGCACAG	GGCGTCGGCG	TACAGTTGAC	GCGCAACGGT
	<u>C</u> GTCGTTTTC	ACCT <u>T</u> GCA <u>A</u> CAG	GGCGTCGGCG	TACAGTTGAC	GCGCAACGGT
751	ACGATTATTC	CAGCGAATAA	CACGGTATCG	TTAGGAGCAG	TAGGGACTTC
	ACGATTATTC	CAGCGAATAA	CACGGTATCG	TTAGGAGCAG	TAGGGACTTC
801	GGCGGTGAGT	CTGGGATTAA	CGGCAAATTA	TGCACGTACC	GGAGGGCAGG
	GGCGGT <u>G</u> AGT	CTGGGATTAA	CGGCAAATTA	<u>T</u> GCA <u>C</u> GTACC	GG <u>A</u> GGGCAGG
851	TGACTGCAGG	GAATGTGCAA	TCGATTATTG	GCGTGACTTT	TGTTTATCAA
	TGACT <u>T</u> G <u>C</u> AGG	GAATGTGCAA	TCGATTATTG	GCGTGACTTT	TGTTTATCAA
901	TAA				
	TAA				

Abbildung 3-34: Vergleich zwischen den identifizierten Mutationen in den *fimH*-Varianten der Proben, die in dieser Arbeit untersucht wurden (obere Zeile; Sequenzabschnitt 76-707), und den *fimH*-Sequenzen, die für das Sondendesign verwendet wurden (untere Zeile, aus 3.1.1). Sämtliche stille Mutationen sind gelb markiert; Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, sind rot hervorgehoben, wobei die in dieser Arbeit berücksichtigten Positionen zusätzlich unterstrichen sind.

Insgesamt konnten 14 der durch Sequenzanalyse gefundenen Polymorphismen in den Proben nicht nachgewiesen werden, während umgekehrt sieben polymorphe Positionen erst durch Untersuchung der Varianten identifiziert wurden. Jeweils zwei Polymorphismen wurden davon durch Proteinsequenzanalyse (142 und 284) bzw. durch eigene Sequenzierungen der Referenzstämme (184 und 538) identifiziert; die Positionen 367, 380 und 550 wurden erst durch Sequenzierung der *fimH*-Varianten der Blindproben jeweils einmal nachgewiesen. Zusätzlich konnten 39 gemeinsame stille Mutationen gefunden werden; acht stille Mutationen in den klinischen Proben wurden neu identifiziert und zwei stille Mutationen konnten in den Blindproben nicht gefunden werden.

3.2.10. Fazit

Die Ergebnisse der systematischen Untersuchung von *fimH*-Varianten verdeutlichen, dass die am häufigsten auftretenden *fimH*-Mutationen durch den Microarray abgedeckt sind. So konnte gezeigt werden, dass der *fimH*-Microarray als neues Instrument zur Charakterisierung von *E. coli*-Isolaten eingesetzt werden kann, um (1) die phylogenetische Typisierung von Isolaten zu ergänzen und (2) mit bestimmten Symptomen in Verbindung gebrachte Mutationen nachzuweisen. Damit ist dieser Microarray eine vielversprechende Grundlage für neue diagnostische Werkzeuge, die auf virulenzbasierten Faktoren basieren.

3.3. Validierung des *gyrA*-Microarrays

3.3.1. Analyse von *gyrA*-Sequenzen und Sondendesign

Mit Hilfe der *gyrA*-Sequenz des Referenzstammes MG1655 wurden in Blastn 48 homologe DNA-Sequenzen in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen gefunden. Der Sequenzvergleich der jeweiligen *gyrA*-QRDR ist in Abbildung 3-35 dargestellt. Die Sequenzierung der *gyrA*-Varianten der zehn Referenzstämme ergab keine zusätzlichen Informationen. Im Vergleich zu einer vorangegangenen Studie (Yu et al. 2004) wurde nur die Region des Vorwärtsprimers (Tabelle 2-4) übernommen, die an die thermodynamischen Parameter der *fimH*-Primer angepasst wurde (Nukleotide 159 bis 177). Aufgrund der neuen publizierten Sequenzen mussten für den Rückwärtsprimer (Positionen 519 bis 535) und die Prozesskontrolle (194 bis 210)

	230	240	250	260	270	280	290
AY301146T.....T.....
AY301143T.....T.....
AY301144T.....T.....
AY301145T.....T.....
AY301147T.....T.....
AY301148T.....T.....
AF038431T.....T.....
AY065799T.....
AY065798T.....
AY065797T.....
AY065796T.....
AY065795T.....
AY065794T.....
AY065793T.....
AY065792T.....
AY065791T.....
X06373T.....
X06744
U00096	ACCATCCCCATGGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATCGTCCGCATGGCGCAGCCATTCTC						
AP009048
X57174
Y00544	A.....
AE005174	A..T.....	T.....
BA000007	A..T.....	T.....
DQ447134	T.....	A.....	T.....
DQ447131	T.....	A.....	T.....
DQ447128	T.....	A.....	T.....
DQ447127	T.....	A.....	T.....
DQ447125	T.....	A.....	T.....
DQ447123	T.....	A.....	T.....
DQ447130	T.....	A.....	T.....
DQ447121	T.....	A.....	T.....
DQ447124	T.....	A.....	T.....
DQ447129	T.....	A.....	T.....
DQ447122	T.....	A.....	T.....
DQ447126	T.....	A.....	T.....
DQ447132	T.....	A.....	T.....
DQ116794	T.....	T.....
DQ116793	T.....	A.....	T.....
DQ447133	T.....	T.....
CP000247	T.....
AF052254	T.....
AE014075	T.....
DQ231459T.....
DQ231458T.....	T.....
AY323805	T.....
AY323806	T.....	T.....
AY323807	T.....	T.....
CP000243	T.....
Consensus	*****	*****	*** ** **	*****	*****	*****	*****

Abbildung 3-35: Vergleich der 49 veröffentlichten *gyrA*-QRDR-Sequenzen. Die Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch an den Positionen 83 und 87 führten, sind dabei durch die roten Kästen markiert. Bei den anderen Mutationen handelt es sich um stille Mutationen, die keinen Einfluss auf den Phänotyp hatten.

andere Regionen mit einer höheren Homologie gewählt werden. Mit den neu entwickelten Primern resultierte ein *gyrA*-Produkt von 377 Basenpaaren. Für die Entwicklung der allelspezifischen Sonden wurden vier verschiedene Mutationen in den Sequenzen identifiziert, die zu einem Aminosäureaustausch und damit zu einer potentiellen Fluorchinolonresistenz führen. Zusätzlich waren in diversen Publikationen weitere Mutationen beschrieben, die von Ruiz zusammengefasst wurden (Ruiz 2003). An der Position 83 konnte Serin durch Mutation des Cytidins an Position 248 gegen Leucin (TCG → TIG) bzw. gegen Tryptophan (TCG → TGG) ausgetauscht werden. Aspartat 87 konnte aufgrund der Mutation des Guanosins an Position 259 zu Asparagin (GAC → AAC), Histidin (GAC → CAC) und Tyrosin (GAC → TAC) bzw. durch Mutation des Adenosins an Position 260 zu Valin (GAC → GTC) und Glycin (GAC → GGC) ausgetauscht werden. Zusätzliche publizierte Mutationen an der Position 247, die direkt (TCG → GCG; Alanin) bzw. in Kombination mit einer Mutation an Position 248 (TCG → GTG; Valin) zu einem Aminosäureaustausch führten, sowie Mutationen an anderen Positionen in der QRDR wurden aufgrund mangelnder Relevanz nicht berücksichtigt. Außerdem wurden für das Sondendesign zwei stille Mutationen an den Positionen 252 und 255 in unmittelbarer Nähe der kritischen Positionen einbezogen; weitere stille Mutationen an den Positionen 267 und 273 spielten für das Sondendesign keine Rolle. Bei der Entwicklung aller *gyrA*-spezifischen Sonden wurden die thermodynamischen Parameter an die Vorgaben des *fimH*-Microarrays ($T_m \approx 53 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta G_{\text{Hairpin}} > -1 \text{ kcal/mol}$; $\Delta G_{\text{Dimer}} > -6 \text{ kcal/mol}$) angepasst, um eine spätere Integration zu ermöglichen.

3.3.2. Amplifizierung von *gyrA*

Die Amplifizierung der *gyrA*-QRDR mit Hilfe der neu entwickelten Primer GyrA_159-176f und GyrA_519-535r, deren Schmelztemperatur von 49,8 °C bzw.

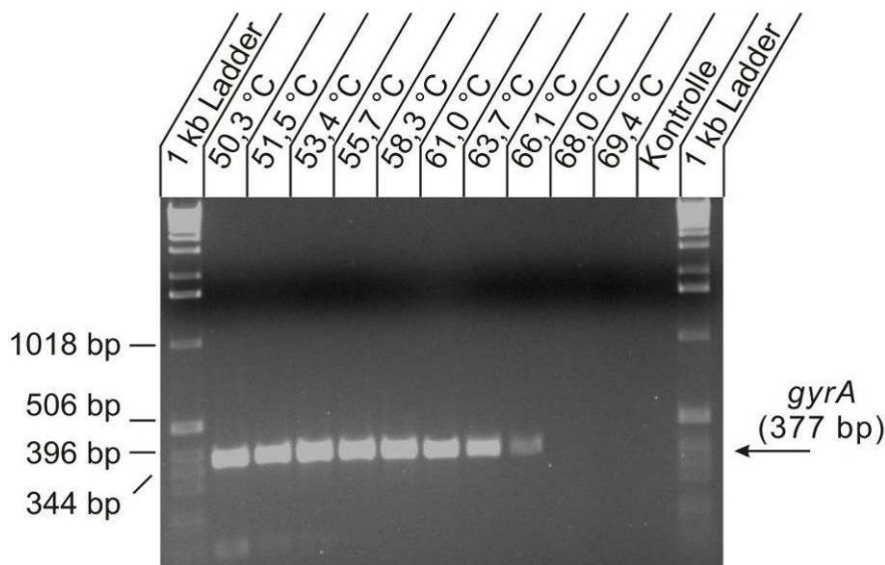


Abbildung 3-36: Amplifizierung der MG1655 *gyrA*-QRDR durch eine Gradienten-PCR mit den neu entwickelten Primern GyrA_159-176f und GyrA_519-535r, wobei verschiedene Annealingtemperaturen zwischen 50,3 und 69,4 °C gewählt wurden. Für die Negativkontrolle wurde eine Annealingtemperatur von 50,3 °C verwendet.

50,4 °C nur unwesentlich höher lag als die der *fimH*-Primer, wurde in einer Gradienten-PCR mit der *gyrA*-Variante des Referenzstamms MG1655 mit Annealingtemperaturen zwischen 50,3 und 69,4 °C getestet. Durch Kontrolle auf einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel konnte ein PCR-Produkt bis zu einer Annealingtemperatur von 63,1 °C ohne signifikanten Ausbeuteverlust nachgewiesen werden (Abbildung 3-36); außerdem waren keine unerwünschten Nebenprodukte durch die Amplifizierung zu sehen. Die Primer GyrA_159-176f und GyrA_519-535r konnten somit erfolgreich an die thermodynamischen Vorgaben der *fimH*-Primer angepasst werden und wurden für alle weiteren Amplifizierungen und Sequenzierungen verwendet.

3.3.3. Validierung der *gyrA*-Sonden mit den Referenzstämmen

Die neu entwickelten Primer wurden für eine Markierungs-PCR der *gyrA*-Variante des Referenzstamms MG1655 verwendet. Zur Etablierung der *gyrA*-Sonden wurde das markierte PCR-Produkt mit dem *gyrA*-Microarray bei den für den *fimH*-Microarray optimalen Hybridisierungsparametern (2h bei 50 °C; 2x SSPE und 0,001 % SDS) hybridisiert (Abbildung 3-37). Dabei setzte sich bei diesem Array ein SONDENSATZ aus zwei Mal vier Sonden zusammen, um die oben erwähnten stillen Mutationen an den Positionen 252 und 255 mit abzudecken.

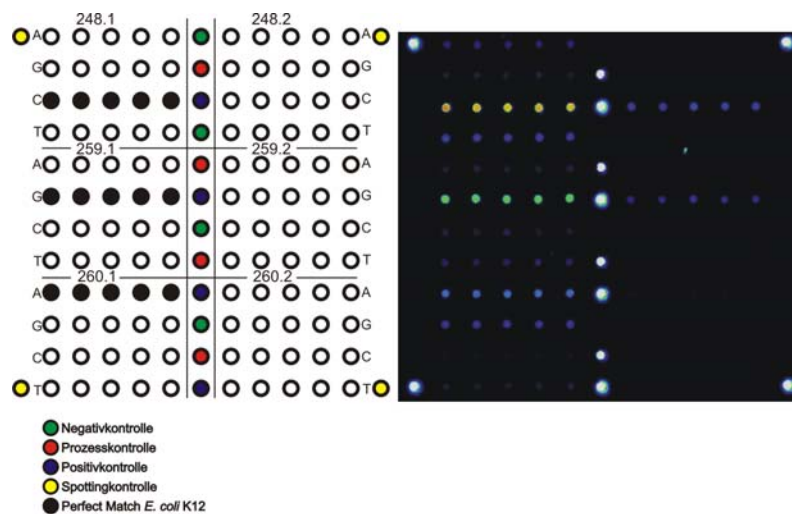


Abbildung 3-37: Layout des *gyrA*-Microarrays und ein in Falschfarben dargestelltes Fluoreszenzbild einer Hybridisierung mit der *gyrA*-Variante von *E. coli* MG1655 bei Standardbedingungen.

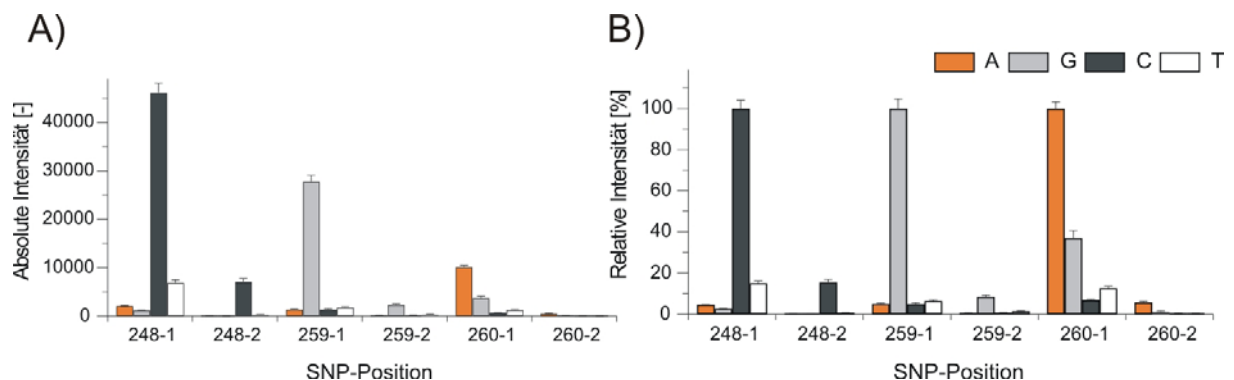


Abbildung 3-38: Absolute (A) und relative (B) Intensitäten der Hybridisierung von MG1655 *gyrA* mit den neu entwickelten *gyrA*-Sonden

Ergebnisse

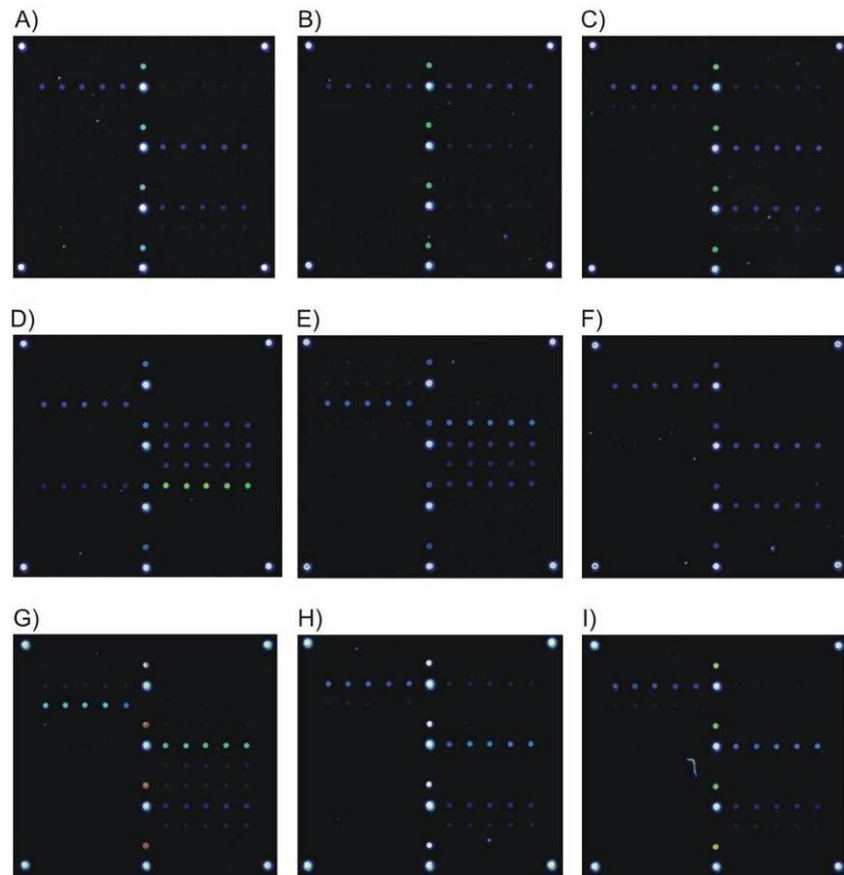


Abbildung 3-39: Fluoreszenzbilder der Hybridisierungen der *gyrA*-Varianten von A) CFT071, B) EDL933, C) IHE3034, D) U15882, E) U33041, F) BEN374, G) BEN2908, H) BEN79 und I) 536

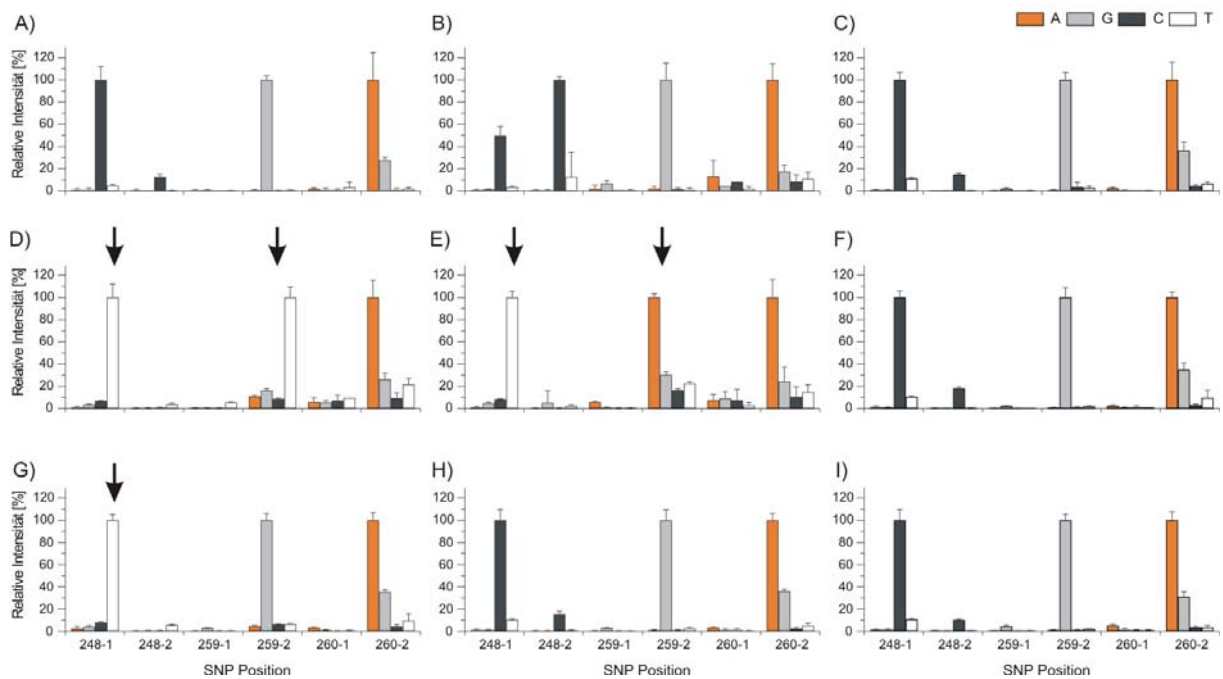


Abbildung 3-40: Relative Fluoreszenzintensitäten der Hybridisierungen der *gyrA*-Varianten von A) CFT071, B) EDL933, C) IHE3034, D) U15882, E) U33041, F) BEN374, G) BEN2908, H) BEN79 und I) 536. Die relevanten Missensemutationen an den Positionen 248-1 und 259-2 sind jeweils mit einem Pfeil markiert.

Die absoluten und relativen Intensitäten dieses Versuches sind in Abbildung 3-38 dargestellt. Für alle drei Sondensätze konnte eindeutig die jeweils richtige Variante identifiziert werden, wobei ein mRI von 5,9 % errechnet wurde. Insgesamt 20 von 21 Mismatchsonden (95,2 %) wiesen dabei ein relatives Signal von weniger als 20 % auf, lediglich die Sonde 260-1C hatte ein höheres relatives Signal mit einem RI_{260-1C} von 39,8 %. Mit diesen Sondensätzen gelang im Vergleich zu den *fimH*-Sonden eine deutlich höhere Diskriminierung.

Im nächsten Schritt wurden die *gyrA*-Sonden mit den neun anderen Referenzstämmen getestet. Aufgrund der guten Diskriminierung ließen sich die allelischen Varianten bereits durch Betrachten der Fluoreszenzbilder der Hybridisierungen (Abbildung 3-39) identifizieren. Die Isolate U15882 (D), U33041 (E) und 536 (I) wiesen an der Position 248 anstatt des Cytosins ein Thymidin auf, das eine Mutation des Serins an Aminosäureposition 83 zu Leucin verursachte. Zusätzlich wiesen an der Position 259 die *gyrA*-Variante des Isolats U15882 die Mutation von Guanosin zu Thymidin (AS 87 D → Y) und die *gyrA*-Variante des Isolats U33041 die Mutation zu Adenosin (AS 87D → N) auf. In diesen drei Isolaten konnte somit eine potentielle Fluorchinololonresistenz auf genetischer Ebene nachgewiesen werden.

Die quantitative Auswertung (Abbildung 3-40) bestätigte diese Resultate. Durchschnittlich wurde in diesen Versuchen ein $mRI = 5,2 \pm 1,6$ % erzielt. In dem Versuch mit *E. coli* EDL933 wiesen alle Sonden einen RI_{MM} von < 20 % auf. Nur die Sonde 248-1G hatte einen vergleichsweise hohen RI_{248-1G} von 50,1 %. Dies spielte jedoch keine wichtige Rolle, da durch diese Sonde kein kritisches Nukleotid, sondern nur die stille Mutation an Position 252 abgedeckt war. In Abbildung 3-41 sind diese Ergebnisse zusammen gefasst, wobei hierin die Prävalenz der stillen Mutation an Position 255 deutlich wird. Zusammenfassend konnten durch die Hybridisierung mit den Referenzstämmen die drei in der Sequenzanalyse häufigsten Mutationen validiert werden.

Stamm bzw. Isolat (phyl. Gruppe)	Serotyp	Symptom	stille Mutationen		missense Mutationen	
			252	255	S83	D87
W3110 (A)	OR:H48:K-	Referenz				
EDL933 (A)	O157:H7	EHEC	A	T		
CFT073 (B2)	O6:H1:K?	ExPEC		T		
U15822 (B1)	O153:H31	chronische UTI		T	L	Y
U33041 (D)	O2:H42	chronische UTI		T	L	N
BEN79 (B2)	nd	ExPEC		T		
BEN374 (B2)	nd	ExPEC		T		
BEN2908 (B2)	nd	ExPEC		T	L	
536 (B2)	O6:K15:H31	ExPEC		T		
IHE3034 (B2)	O18:K1:H7	MNEC		T		



 korrekt negativ
 korrekt positiv

Abbildung 3-41: Zusammenfassung der *gyrA*-Hybridisierungsergebnisse mit den zehn Referenzstämmen unter Berücksichtigung der stillen Mutationen an den Nukleotidpositionen 252 zu Adenosin (A) und 255 zu Thymidin (T) sowie der Missensemutationen, die an Position 83 zu Leucin (L) und an Position 87 zu Tyrosin (Y) bzw. Asparagin (N) führten.

3.4. Integration des *gyrA*-Microarrays

3.4.1. Simultane Amplifizierung von *gyrA* und *fimH*

Da sowohl die neu entwickelten *gyrA*-Primer als auch die *gyrA*-Sonden erfolgreich validiert werden konnten, wurden die beiden Microarrays integriert, d.h. beide Ansätze wurden in einem Assay vereint. In einem ersten Schritt wurden die beiden Amplifizierungen in einem Ansatz gleichzeitig durchgeführt. Dabei wurde das *fimH*-Primerpaar im Vergleich zum *gyrA*-Primerpaar mit einem Überschuss von 0,5 μM zu 0,2 μM verwendet, da bei gleicher Konzentration deutlich mehr *gyrA* amplifiziert wurde. In Abbildung 3-42 ist exemplarisch ein ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel zur Kontrolle der simultanen Amplifizierung beider Genregionen aus der genomischen DNA von acht klinischen Isolaten dargestellt, wobei eine gleichmäßige Verteilung der beiden PCR-Produkte nachgewiesen werden konnte.

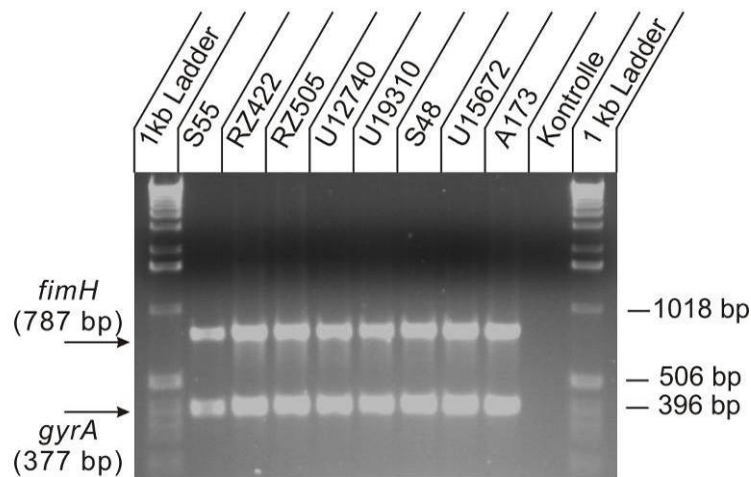


Abbildung 3-42: Exemplarische Amplifizierung von *gyrA* und *fimH* aus der genomischen DNA von acht klinischen Isolaten. Die Primerpaare wurden im Verhältnis *fimH*- zu *gyrA*-Primer 2,5:1 eingesetzt.

3.4.2. Untersuchung der Kreuzhybridisierungen

Um den Anteil der falsch-positiven Signale zu ermitteln, wurden die beiden markierten PCR-Produkte des Referenzstammes MG1655 separat mit dem integrierten Microarray hybridisiert. Die absoluten Signalintensitäten beider Versuche sind in Abbildung 3-43 dargestellt. Dabei konnten für die Hybridisierung von *gyrA* mit dem *fimH*-Subarray maximale Signale von 200 absoluten Fluoreszenzeinheiten, von *fimH* mit dem *gyrA*-Subarray von maximal 400 Einheiten gemessen werden. Durch Berechnung des Verhältnisses des jeweils falsch-positiven PM zum korrekt-positiven PM, z. B. für den Sondensatz GyrA_{248} : $\text{GyrA}_{248-1A}^{\text{fimH}}$ zu $\text{GyrA}_{248-1C}^{\text{gyrA}}$, konnte der Anteil der Kreuzhybridisierung bei der Auswertung der Signale und damit der zusätzliche Anteil an dem relativen Signal bestimmt werden (Abbildung 3-44). Dabei wurden für den *gyrA*-Subarray Intensitätsanteile für *fimH* von 0,7 % (Sondensatz 259), 4,1 % (Sondensatz 248) und 8,9 % (Sondensatz 260) berechnet. Deutlich geringere Anteile waren für *gyrA* auf dem *fimH*-Subarray zu verzeichnen: Insgesamt 88 % der Sonden hatten einen falsch-positiven Anteil von unter 1 %; nur für die

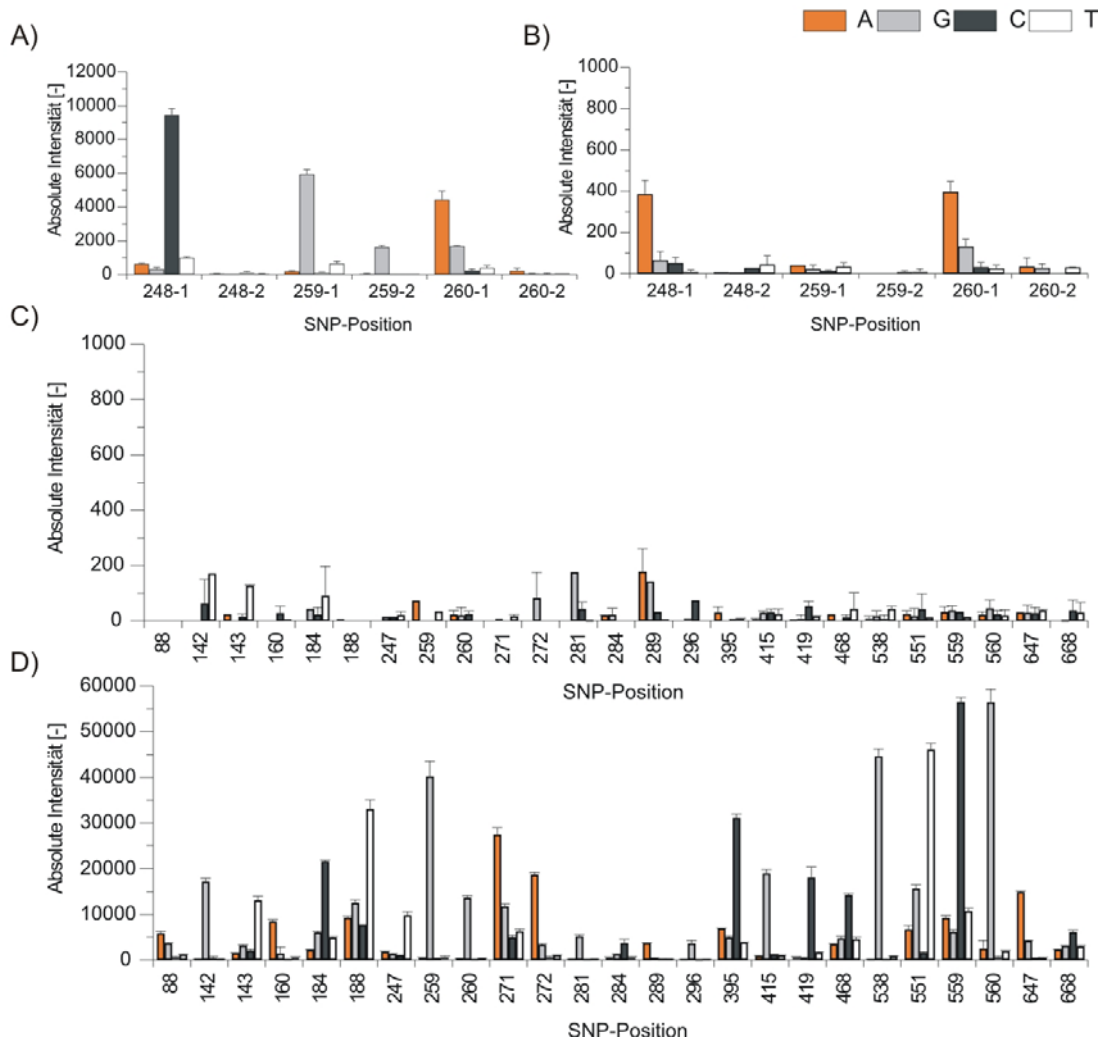


Abbildung 3-43: Ergebnisse der getrennten Hybridisierung der beiden PCR-Produkte mit dem integrierten Microarray zur Bestimmung der Kreuzhybridisierungen. Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzintensitäten der Hybridisierung von *gyrA* mit dem *gyrA*-Subarray (A) und dem *fimH*-Subarray (C), sowie von *fimH* mit dem *gyrA*-Subarray (B) und dem *fimH*-Subarray (D). Zu beachten sind die verschiedenen Skalierungen der Ordinate.

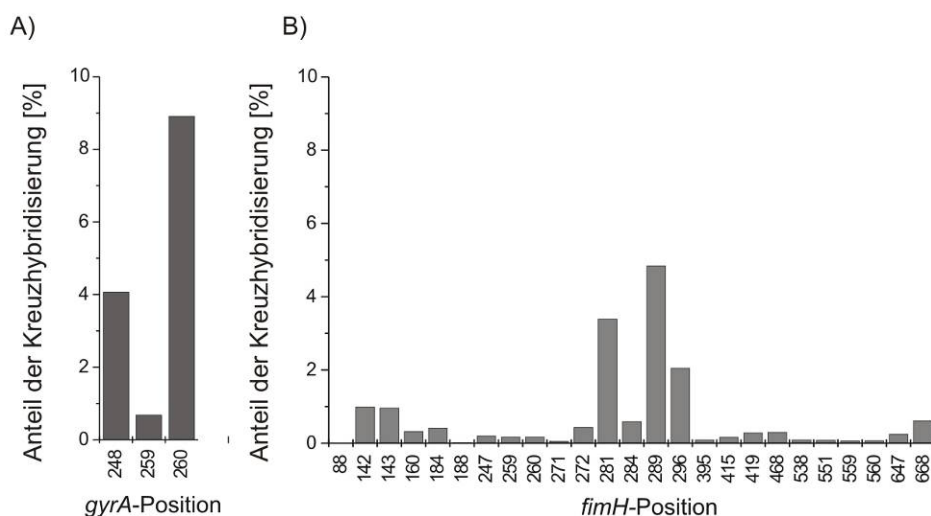


Abbildung 3-44: Signalanteile im *gyrA*-Subarray (A) und *fimH*-Subarray (B) des jeweiligen falsch-positiven PMs im Verhältnis zum korrekt-positiven PM.

Sondensätze der Positionen 296 mit 2,1 %, 281 mit 3,4 % und 289 mit 4,9 % wurden etwas höhere Anteile festgestellt. Die Kreuzhybridisierungen waren für diese beiden Zielgene minimal und konnten daher für die weiteren Betrachtungen vernachlässigt werden.

3.4.3. Validierung des integrierten Microarrays

Aufgrund der minimalen falsch-positiven Signale wurden im nächsten Schritt die MG1655 *fimH*- und *gyrA*-PCR-Produkte aus einer simultanen Amplifizierung mit dem integrierten Microarray hybridisiert (Abbildung 3-45). Die relativen Fluoreszenzeinheiten dieses Versuchs sind in Abbildung 3-46 dargestellt. Dabei konnte für den *fimH*-Subarray ein RI_{MM} von 15,0 % ermittelt werden, wobei 69,3 % aller Mismatchsonden einen RI_{MM} -Wert von < 20 % hatten und nur für die Mismatchsonden 88G und 668G ein $RI_{MM} > 60$ % berechnet wurde: $RI_{88G} = 65,7$ % und $RI_{668G} = 63,9$ %. Für den *gyrA*-Subarray wurde ein RI_{MM} von 6,8 % ermittelt, wobei alle Mismatchsonden einen $RI_{MM} < 40$ % und 90,5 % aller Sonden einen $RI_{MM} < 20$ % hatten. Damit ist die Diskriminierung der allelischen Varianten bei der simultanen Hybridisierung nur unwesentlich schlechter als in den separaten Hybridisierungen (siehe 3.1.3 und 3.3.3).

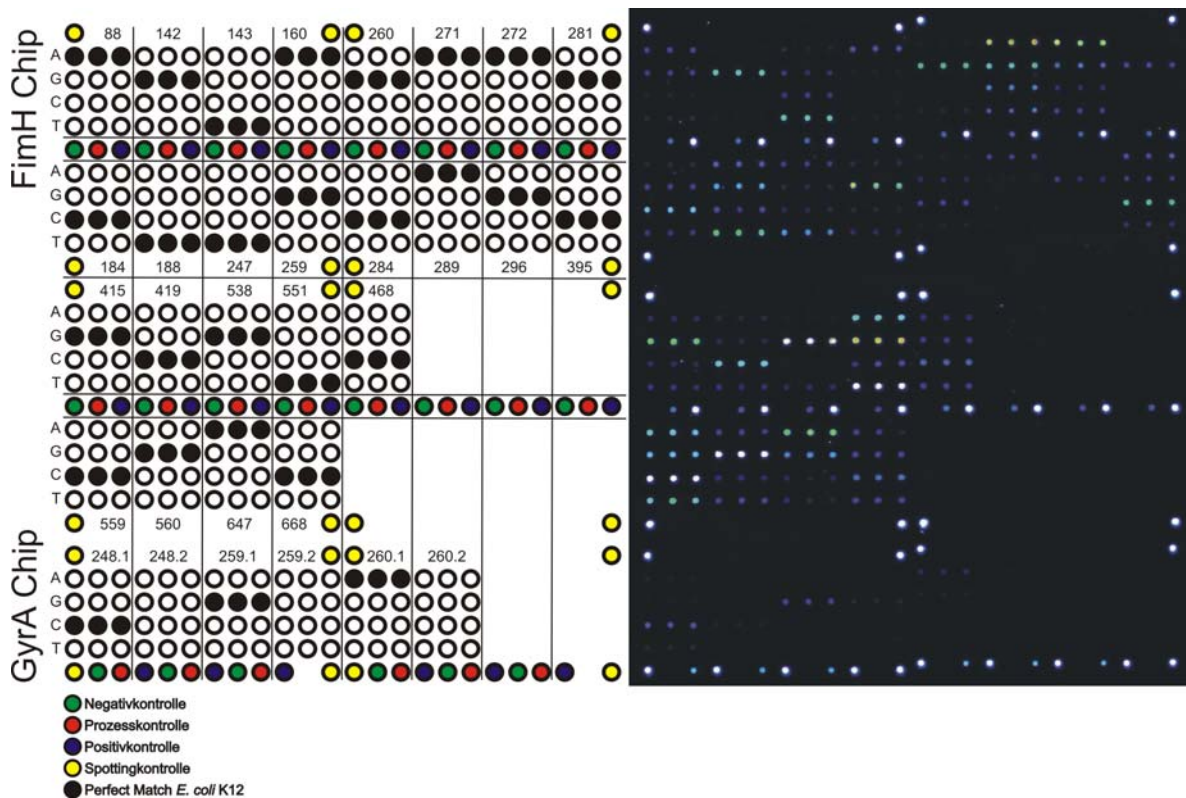


Abbildung 3-45: Arraylayout des kombinierten Arrays und ein Fluoreszenzbild in Falschfarbendarstellung einer Hybridisierung mit den *gyrA*- und *fimH*-Varianten von *E. coli* MG1655, die in einer Duplex-PCR simultan amplifiziert wurden.

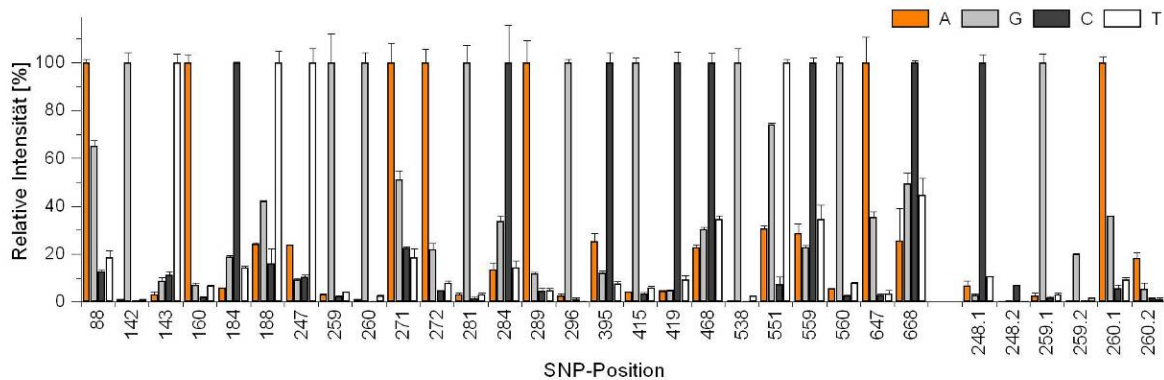


Abbildung 3-46: Relative Fluoreszenzintensitäten bei der simultanen Hybridisierung der *fimH*- und *gyrA*-Produkte in einem Ansatz. Dabei sind links die Signale der 25 SONDENSÄTZE des *fimH*-Subarrays, rechts die Signale der drei SONDENSÄTZE des *gyrA*-Subarrays dargestellt.

3.4.4. Untersuchung von verblindeten Proben

Nach den einleitenden Versuchen mit dem Referenzstamm wurden die *fimH*-/*gyrA*-Varianten der weiteren klinischen Proben mit dem integrierten Microarray hybridisiert, die bereits mit dem *fimH*-Microarray untersucht wurden; zusätzlich wurde die *gyrA*-Variante eines *fimH*-negativen Isolats (*E. coli* U25216) hybridisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-47 zusammengefasst. Zum einen wurden keine Diskrepanzen zur separaten *fimH*-Hybridisierung (3.2) beobachtet. Zum anderen wurden weder falsch-positive noch falsch-negative Ergebnisse im *gyrA*-Subarray festgestellt, was durch die Ergebnisse der Sequenzierungen der jeweiligen *gyrA*-QRDR gezeigt werden konnte.

Insgesamt wiesen 20 der Isolate mindestens eine Mutation in der *gyrA*-QRDR auf, die zu einem Aminosäureaustausch an den Positionen 83 und/oder 87 und damit zu einer potentiellen Fluorchinolonresistenz führen. Dabei konnten in den 13 Isolaten des Serotyps O153:H31 die beiden Mutationen S83L und D87Y identifiziert werden. Das Mutationsmuster S83L / D87N wurde in den Isolaten U12587, U25216, B19062, U2441 und 177115 nachgewiesen, während das Isolat 39350 die einzelne Mutation D87N hatte und das Isolat F11 die einzelne Mutation S83L aufwies. Interessanterweise konnten damit Mutationen nur in Isolaten nachgewiesen werden, deren Wirte eine Harnwegsinfektion als Symptom aufwiesen. Dagegen waren sämtliche Isolate aus Fäces, Meningitisinfektionen sowie einer Vogelinfektion offensichtlich fluorochinolonsensitiv. Die Sequenzierungen ergaben zusätzlich, dass keine weitere Mutation in diesen Isolaten auftrat; der Subarray deckte somit alle in dieser Studie relevanten Varianten ab. Durchschnittlich wurde für den *fimH*-Subarray ein mRI-Wert von $16,4 \pm 1,8$ %, für den *gyrA*-Subarray ein mRI von $10,0 \pm 3,1$ % ermittelt. Diese sind in etwa mit den Ergebnissen der separaten Hybridisierungen vergleichbar.

Ergebnisse

Stamm bzw. Isolat (phyl. Gruppe)	Serotyp	Symptom	FimH										GyrA			
			V27A	Q41K	S62A	G66S	G66C	N70S	T74I	S78N	A119V	R166H	S83	D87		
AC/1 (B1)	nd	APEC														
ABU12 (B2)	nd	asypomatisch														
ABU16 (B2)	nd	asypomatisch														
ABU20 (B2)	nd	asypomatisch														
ABU21 (B1)	nd	asypomatisch														
ABU27 (B2)	nd	asypomatisch														
ABU37 (B2)	nd	asypomatisch														
ABU38 (B1)	nd	asypomatisch														
ABU57 (A)	nd	asypomatisch														
ABU62 (B1)	nd	asypomatisch														
ABU63 (B2)	nd	asypomatisch														
ABU64 (B2)	nd	asypomatisch														
ABU83972 (B2)	nd	asypomatisch														
U12587 (A)	O101:H-	chronische UTI												L	N	
U25216 (A)	O101:H-	chronische UTI	<i>fimH</i> ⁻										L	N		
B19062 (D)	O102:H6	chronische UTI												L	N	
B04058 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
B10490 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U12633 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U12740 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U15156 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U15451 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U15672 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U15762 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U17709 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U19010 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U19264 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U19310 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U23741 (B1)	O153:H31	chronische UTI												L	Y	
U24421 (D)	O2:H42	chronische UTI												L	N	
S48 (D)	O1:K1	ExPEC														
S55 (A)	O16:K1	ExPEC														
S44 (B2)	O18:K1	ExPEC														
S49 (B2)	O18:K1	ExPEC														
S6 (B2)	O18:K1	ExPEC														
S39 (D)	O7:K1	ExPEC														
S87 (B2)	Ond:K1	ExPEC														
764 (B2)	O18:K1:H7	Fäcalisolat														
A152 (B2)	O7:K1:H5	Fäcalisolat														
A173 (D)	O18:K5:H5	Fäcalisolat														
RS218 (B2)	O18:K1:H-	MNEC														
P42 (B2)	O1:K1:H7	Pyeloniphritis														
10413/93 (B2)	nd	Sepsis														
C25 (A)	nd	Sepsis														
39350 (B2)	O25	UTI													N	
177115 (B2)	O25	UTI												L	N	
F11 (B2)	nd	UTI												L		
RZ422 (B2)	O6:K14:H-	UTI														
RZ479 (B2)	O6:K14:H	UTI														
RZ505 (B2)	O6:K+:H31	UTI														
RZ532 (B2)	O6:K+:H-	UTI														

korrekt negativ
 korrekt positiv

Abbildung 3-47: Zusammenfassung der Ergebnisse der simultanen Hybridisierung von *fimH*- und *gyrA*-Varianten der 51 Proben mit dem integrierten Microarray. Für den *fimH*-Subarray sind nur die Positionen aufgeführt, bei denen teilweise positive Ergebnisse beobachtet wurden. Auf die Darstellung der stillen Mutationen in *gyrA* wurde verzichtet.

3.4.5. Untersuchung der ECOR-Isolate

Die 72 Stämme der ECOR-Sammlung wurden ebenfalls mit dem integrierten Array untersucht. Dabei konnten für den *fimH*-Subarray wiederum keine abweichenden Ergebnisse beobachtet werden. In den *gyrA*-Varianten konnten keine Mutationen an den Positionen 248, 259 und 260 nachgewiesen werden, die zu einem Aminosäureaustausch geführt hätten. Dagegen wurde in insgesamt 53 Isolaten die stille Mutation an Position 255 C → T eindeutig nachgewiesen, wobei es sich dabei um sämtliche Isolate der phylogenetischen Gruppen B1, B2, D und E handelte. Innerhalb der Gruppe A wiesen dagegen nur 6 Stämme diese stille Mutation auf. Umgekehrt hatten nur die restlichen 19 Stämme der Gruppe A die Wildtypvariante 255 C, nämlich die ECOR-Stämme 01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21 und 25. In Abbildung 3-48 sind exemplarisch die Ergebnisse von zwei Hybridisierungen der *gyrA*-Varianten von ECOR01 (Gruppe A) und ECOR44 (Gruppe D) dargestellt. Die stille Mutation an Position 255 in ECOR 44 konnte durch die signifikant höheren Signale im jeweils zweiten Sondensatz der Positionen 259 und 260 nachgewiesen werden.

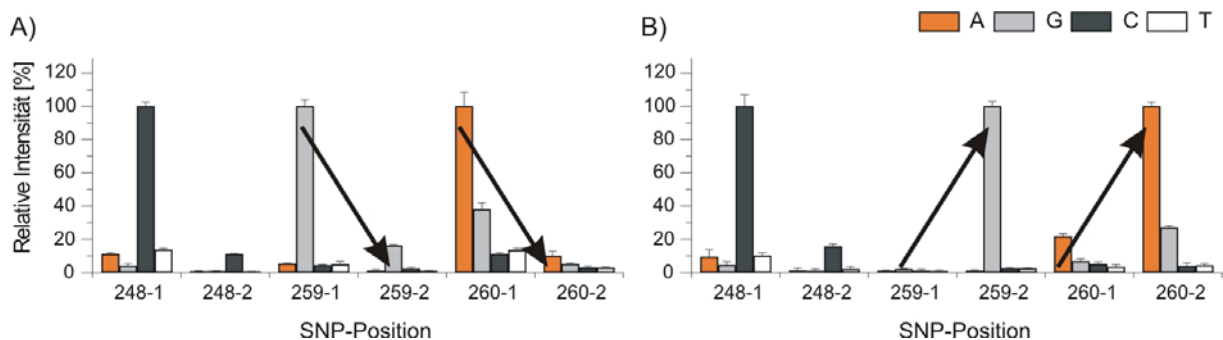


Abbildung 3-48: Relative Fluoreszenzintensitäten der *gyrA*-Subarrays der Hybridisierungen mit den *gyrA*-Varianten von A) ECOR01 (entspricht der Referenzsequenz) und B) ECOR44 mit der stillen Mutation an Position 255.

Dieses Ergebnis wurde durch eine nähere Betrachtung der *gyrA*-Varianten der Referenzstämme und der klinischen Isolate unterstützt. Davon wiesen ebenfalls alle Isolate der Gruppen B1, B2, D und E die stille Mutation 255 C → T auf, während die Wildtypvariante nur in sechs von sieben Isolaten der Gruppe A gefunden wurde (MG1655, ABU57, U12587, U25216, S55 und C25). Die allelische Variante 255C (entspricht der Referenzsequenz) hatte folglich das Potential, als spezifischer Marker für die phylogenetische Gruppe A eingesetzt zu werden.

3.4.6. Untersuchung von resistenten klinischen Isolaten

Neben den Blindproben wurden zusätzlich sechs klinische Isolate (Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart) mit dem integrierten Microarray untersucht. Phänotypische Tests hatten im Vorfeld gezeigt, dass diese Isolate fluorochinolonresistent waren. Die Kontrolle der Amplifizierung beider Zielgene durch ein ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel zeigte, dass die beiden Isolate UR947 und UR1013 *fimH*-negativ waren

Ergebnisse

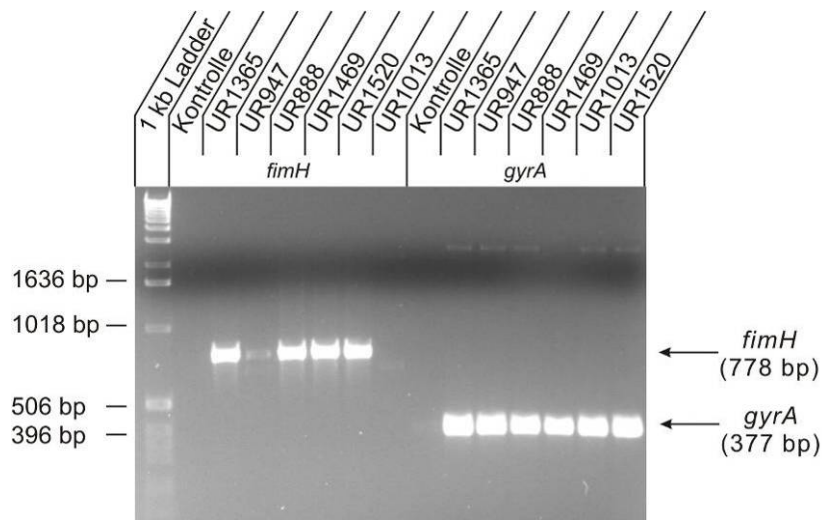


Abbildung 3-49: Kontrolle der separaten Amplifizierung von *fimH* und *gyrA* durch Gelelektrophorese.

(Abbildung 3-49). Auch wurden in beiden Fällen keine auswertbaren Signale nach der Hybridisierung der PCR-Produkte auf dem *fimH*-Subarray beobachtet. In Abbildung 3-50 sind exemplarisch die relativen Fluoreszenzsignale der Hybridisierung mit beiden PCR-Produkten des Isolats UR1520 dargestellt, wobei in *FimH* nur die Mutation V27A, in *GyrA* die Doppelmutation S83L / D87G nachgewiesen wurde.

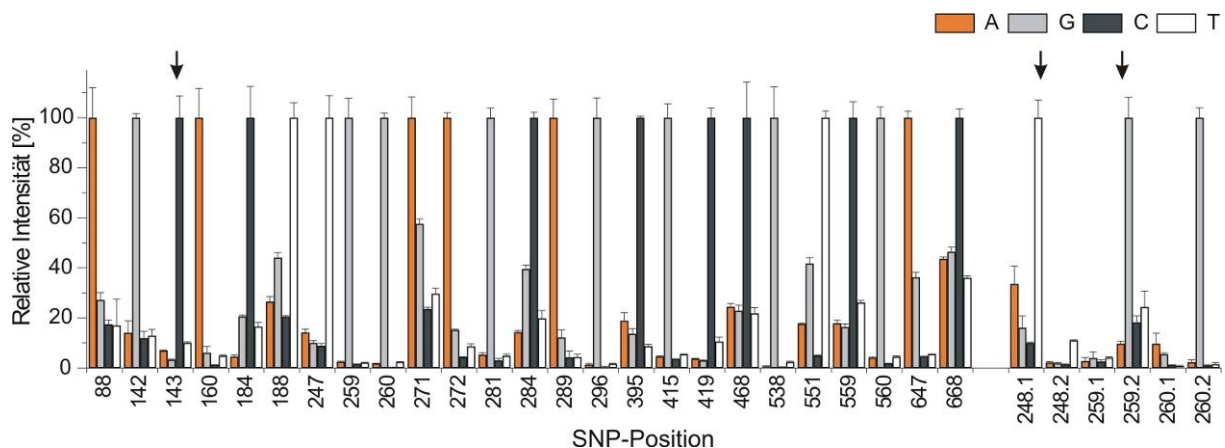


Abbildung 3-50: Relative Fluoreszenzintensitäten der simultanen Hybridisierung der *fimH*- und *gyrA*-Varianten des Isolats UR1520. Die Signale der 25 SONDENSÄTZE für den *fimH*-Subarray sind dabei in der linken Hälfte, die 3 SONDENSÄTZE des *gyrA*-Subarrays in der rechten Hälfte abgebildet.

Die Resultate dieser sechs Versuche sind in Abbildung 3-51 abgebildet, wobei die Sequenzierung beider Fragmente keine widersprüchlichen oder zusätzlichen Ergebnisse lieferte. Zusammenfassend wurde in allen Isolaten eine Doppelmutation in *gyrA* gefunden, auf die die Resistenz der Isolate zurückgeführt werden konnte. Während in dem Isolat UR1520 das Muster S83L / D87G gefunden wurde, konnte in den anderen fünf Isolaten die Doppelmutation S83L / D87N identifiziert werden. Damit wurde mit D87G eine weitere Variante validiert. Weiterhin wies nur die *gyrA*-Variante des Isolats UR947 die allelische Variante 255C auf; hier konnte im Gegensatz zu den anderen Isolaten keine stille Mutation beobachtet werden. Folglich

konnte nach den Ergebnissen der *gyrA*-Varianten der ECOR-Stämme auf eine Zugehörigkeit des Isolats UR947 zur phylogenetischen Gruppe A geschlossen werden. Mit Hilfe des *fimH*-Subarrays wurde für die *fimH*-Varianten der beiden Isolate UR1365 und UR1520 die einzige Mutation V27A identifiziert; für diese Isolate konnte angenommen werden, dass sie nicht zur Gruppe B2 gehörten. Für das Isolat UR888 wurde die Doppelmutation V27A / Y195F gefunden, die nach den vorangegangenen Ergebnissen auf die Zugehörigkeit des Isolats zur Gruppe A (vgl. ECOR05; 3.2.7) schließen ließ. Zuletzt wurden in der *fimH*-Variante des Isolats UR1469 die beiden Mutationen V27A / R166H gefunden, die wie im Isolat 177115 auf die Zugehörigkeit zur Gruppe B2 schließen ließ. Bei der Quantifizierung der vier *fimH*-Subarrays wurde ein mRI von $13,8 \pm 0,9\%$ und bei den sechs *gyrA*-Subarrays ein mRI von $9,1 \pm 2,2\%$ berechnet.

	FimH											GyrA				
	V27A	Q41K	S62A	G66S	G66C	N70S	T74I	S78N	A119V	N135K	G159S	V163A	R166H	Y195F	S83	D87
UR888	■													■	L	N
UR1469	■												■		L	N
UR1365	■														L	N
UR1520	■														L	G
UR947	fimH ⁺											L	N			
UR1013	fimH ⁺											L	N			

korrekt negativ
 korrekt positiv

Abbildung 3-51: Zusammenfassung der Ergebnisse der simultanen Hybridisierung der *fimH*- und *gyrA*-Varianten der sechs klinischen fluorchinolonresistenten Isolate.

3.4.7. Untersuchung des Laborstammes *E. coli* DH5 α

Zum Abschluss wurde die *gyrA*-Variante des kommerziell erhältlichen und für Klonierungsexperimente empfohlenen Laborstammes *E. coli* DH5 α auf Mutationen in der QRDR untersucht. Dabei war in erster Linie interessant, dass dieser Stamm von den Herstellern als chinolonresistent beschrieben und als *gyrA96* annotiert wurde (<http://www.mclab.com>). Jedoch wurden keine weiteren Erläuterungen zu dieser Annotation gefunden (Beate Rössle-Lorch, persönliche Mitteilung). Ebenso wie die Hybridisierung ergab die Sequenzierung von *fimH* keine Abweichungen zu den K12-Referenzstämmen W3110 und MG1655. Jedoch zeigte die Hybridisierung von *gyrA* (Abbildung 3-52), dass an der Nukleotidposition 259 der Austausch von Guanosin zu

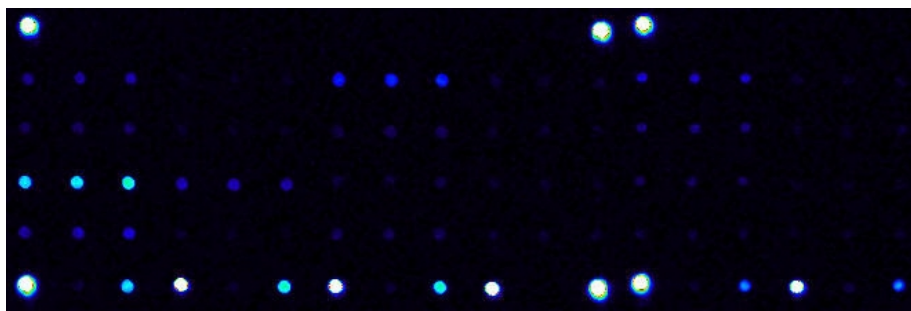


Abbildung 3-52: Ausschnitt des Fluoreszenzbildes der simultanen Hybridisierung der *gyrA*- und *fimH*-Varianten des Laborstammes DH5 α . In diesem Fall ist nur der *gyrA*-Subarray dargestellt.

Ergebnisse

Adenosin stattgefunden hatte, was durch Sequenzierung bestätigt wurde. Dies hatte wie in Isolat 39350 (siehe 3.4.4) die Mutation der Aminosäure 87 von Aspartat zu Asparagin zur Folge. Des Weiteren wurden durch Sequenzierung keine zusätzlichen Mutationen, auch keine stillen Mutationen, in der *gyrA*-QRDR gefunden, so dass die beschriebene Resistenz des Laborstammes DH5 α auf diese einzige Mutation zurückgeführt werden konnte. Mit den vorangegangenen Ergebnissen konnte bei dem *E. coli*-Stamm DH5 α ebenso wie bei den beiden K12-Laborstämmen MG1655 und W3110 aufgrund der Wildtypvariante an Position 255 (keine stille Mutation von C zu T) auf eine Zugehörigkeit zu Gruppe A geschlossen werden.

In Abbildung 3-53 sind schließlich die relativen Intensitäten dieses Experimentes dargestellt, wobei für den *fimH*-Subarray ein mRI = 17,1 %, für den *gyrA*-Subarray ein mRI = 13,5 % berechnet wurde. Der letzte, auffallend hohe Wert ist in erster Linie auf eine vergleichsweise schlechte Diskriminierung innerhalb des Sondensatzes 260 zurück zu führen. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass die direkt benachbarte Mutation an Position 259 erheblichen Einfluss auf die Hybridisierung in diesem Sondensatz hatte und, wie in 3.2.4 beschrieben, potentiell zu einem höheren MM / PM-Verhältnis führte.

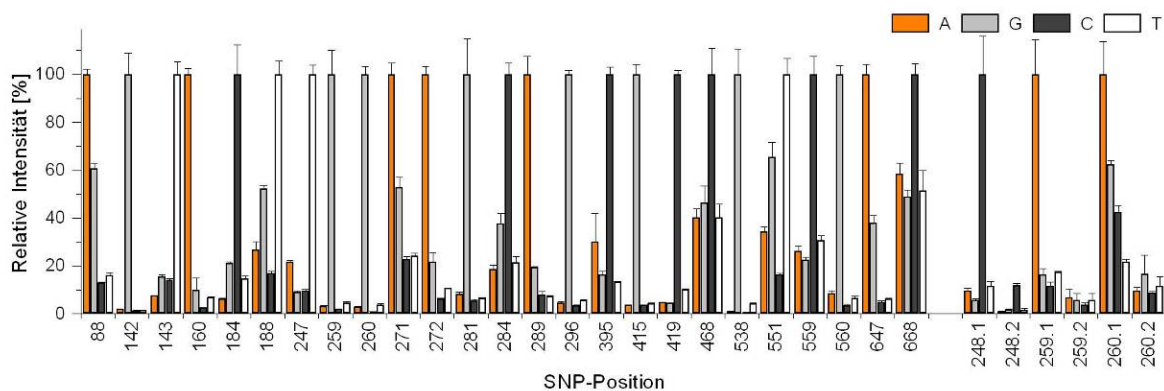


Abbildung 3-53: Relative Intensitäten der Hybridisierung der *gyrA*- und *fimH*-Varianten von *E. coli* DH5 α mit dem integrierten Microarray.

3.4.8. Fazit

Für die Charakterisierung von klinischen Erregerisolaten eröffnet die gleichzeitige Detektion von Virulenz- und Resistenzeigenschaften in Verbindung mit einer phylogenetischen Typisierung neue Möglichkeiten zur Verbesserung der Diagnostik. Die Ergebnisse des kombinierten *gyrA/fimH*-Microarrays verdeutlichten, dass diese drei neuen diagnostischen Ansätze technisch in dieser Arbeit erfolgreich in einem Ansatz vereint werden konnten. Darüber hinaus erwies sich die Reduktion der Anzahl an *gyrA*-Sonden von 40 auf 24 als geeignet, da dieser Ansatz weiterhin einen vollen Informationsgehalt bei der Untersuchung der *gyrA*-Varianten hinsichtlich der Chinolonresistenz gewährleistete.

3.5. Einsatz der Surveyor Nuclease zur verbesserten Genotypisierung

3.5.1. Enzymaktivität in Lösung

Die mismatchspezifische Surveyor Nuclease (optimierte Variante einer CEL II-Endonuklease aus *Apium graveolens*) wurde in verschiedenen Studien in Lösung verwendet, um spezifische Mutationen nachzuweisen. In Abbildung 3-54 sind die Ergebnisse eines Kontrolllexperiments dieser Art dargestellt. Darin wurde deutlich, dass durch die Behandlung der Mischung aus zwei allelischen Varianten G und C neben den eigentlichen Homoduplexen (632 bp) zwei kleine Fragmente (415 und 217 bp) auftraten, die durch die Fragmentierung der jeweiligen Heteroduplexe durch das Enzym entstanden. Diese wurden in den Homoduplexen G und C, die ebenfalls mit der Nuklease inkubiert wurden, nicht nachgewiesen.

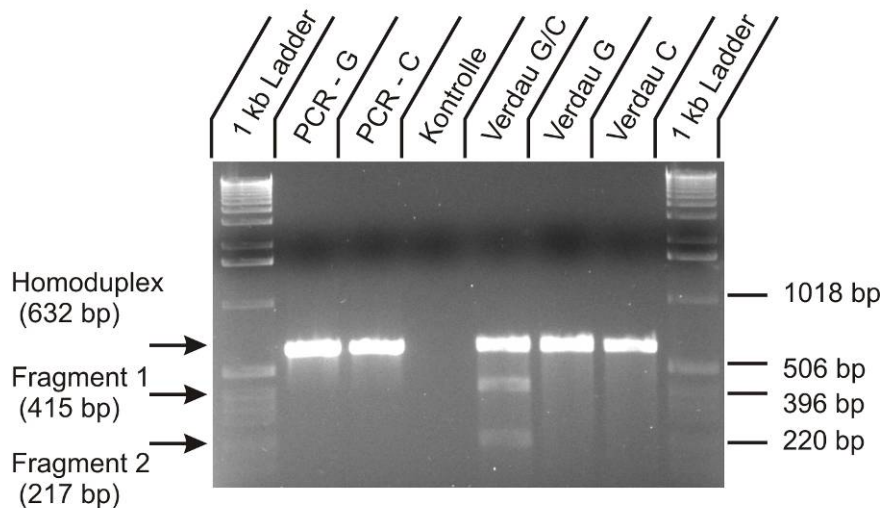


Abbildung 3-54: Ergebnis der Inkubation einer Ziel-DNA mit einer G/C-Fehlpaarung mit der Surveyor Nuclease. Dargestellt sind in den Spuren 2 und 3 die beiden PCR-Produkte, in Spur 4 die Negativkontrolle der PCR, in Spur 5 die Fragmente des Verdau des Heteroduplexes und in den Spuren 6 und 7 die beiden reinen Homoduplexe, die ebenfalls mit der Nuklease inkubiert wurden.

3.5.2. Aktivität des Enzyms auf einem Microarray

Nach der Hybridisierung von drei FimH 551.1 Arrays mit dem fluoreszenzmarkiertem Oligonukleotid 551_TargetC, anschließendem Waschen und Messung der Fluoreszenzsignale wurden die Arrays mit drei unterschiedlichen Lösungen inkubiert. In Abbildung 3-55 sind die Fluoreszenzbilder dieser drei Versuche sowohl vor als auch nach der Behandlung mit der Nuklease abgebildet. Die Arrays wurden A) mit der Nuklease und dem aktivitätsfördernden Detergens, B) nur mit der Nuklease und C) mit 1x *Taq*-Puffer als Negativkontrolle behandelt. Die Abbildungen zeigen, dass zwar in allen drei Ansätzen eine deutliche Reduzierung aller Signale zu beobachten war, die Reduzierung für die Ansätze, in denen die Nuklease verwendet wurde, jedoch signifikant höher ausfiel.

Ergebnisse

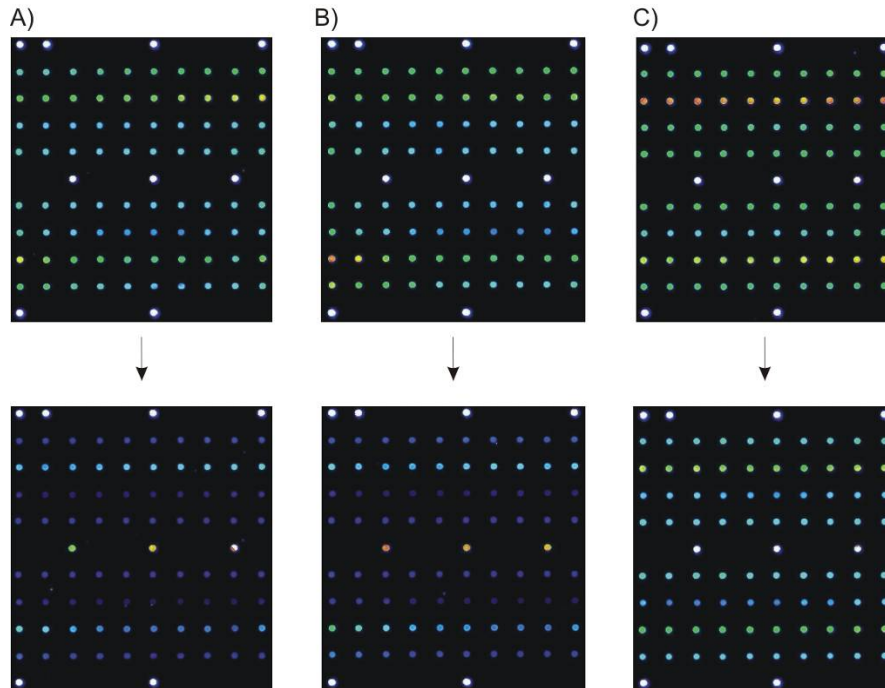


Abbildung 3-55: Fluoreszenzbilder (PMT50) in Falschfarbendarstellung nach Hybridisierung (oben) und anschließender Behandlung (unten). Dabei wurde der Array A) mit Nuklease und Detergens, B) nur mit Nuklease und C) nur mit 1x *Taq*-Puffer als Kontrolle inkubiert.

Die absoluten Signalintensitäten der Kontrollsonden bei PMT35 sind in Abbildung 3-56 dargestellt. Für die einzelsträngige Spottingkontrolle (SK) wurde dabei eine Reduktion der absoluten Fluoreszenzintensität von A) 9153 auf 7455 absolute Einheiten (entspricht einer relativen Reduktion SR = 18,1 %), B) 11396 auf 9078 Einheiten (SR = 20,3 %) und C) 9105 auf 7927 Einheiten (SR = 12,7 %) gemessen. Für die doppelsträngige positive Hybridisierungskontrolle (PHK) wurde eine Verminderung der absoluten Fluoreszenz A) von 4748 auf 2139 Einheiten (SR = 55,7 %), B) von 4898 auf 2051 (SR = 58,1 %) und C) von 4305 auf 2943 Einheiten (SR = 31,6 %) bestimmt. Die deutlich höhere Reduktion der Signale der PHK in dem Kontrollexperiment konnte darauf zurückgeführt werden, dass durch die zusätzliche Inkubationszeit die Stringenz erhöht wurde und sich dadurch ein Anteil

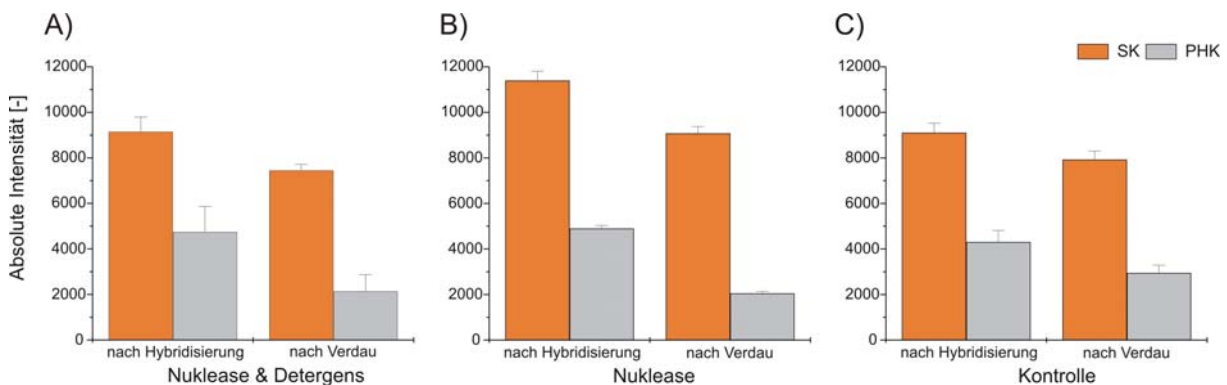


Abbildung 3-56: Gemittelte absolute Signalintensitäten (PMT35) der sechs Spottingkontrollen (SK) und drei positiven Hybridisierungskontrollen (PHK) für die drei Ansätze vor und nach Behandlung mit Nuklease. Dabei wurden im Ansatz A) Nuklease und Detergens, im Ansatz B) nur Nuklease und C) nur 1x *Taq*-Puffer als Kontrolle verwendet.

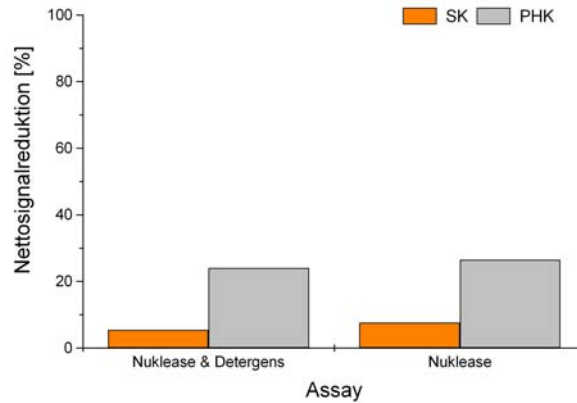


Abbildung 3-57: Nettosignalreduktion der Fluoreszenzsignale der Spottingkontrollen (SK) und der positiven Hybridisierungskontrolle (PHK) nach der Behandlung mit der Nuklease.

der markierten Ziel-DNA wieder von der Sonde löste. Die Nettosignalreduktion der beiden Ansätze A und B sind in Abbildung 3-57 dargestellt. Diese betragen für die Spottingkontrolle in A) $nSR = 5,4 \%$ und in B) $nSR = 7,6 \%$. Für die positive Hybridisierungskontrolle wurden A) $nSR = 24,0 \%$ und B) $nSR = 26,5 \%$ gemessen. Offensichtlich gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ansätzen A und B, die sich nur durch die Detergenzugabe unterschieden. Dieser hatte folglich keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Dagegen wurde für den Komplex aus unmarkierter Sonde und gebundener markierter DNA (PHK) eine deutlich höhere Aktivität im Vergleich zu dem markiertem Einzelstrang (SK) festgestellt.

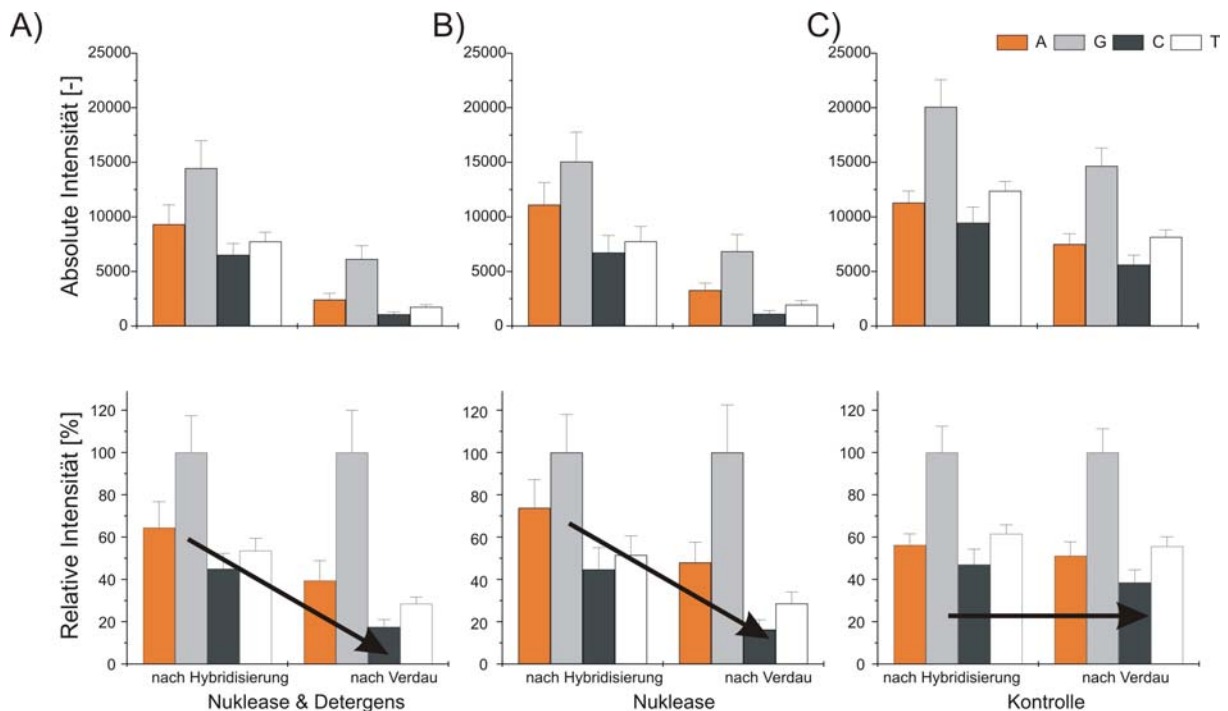


Abbildung 3-58: Gemittelte absolute und relative Signalintensitäten der vier allelspezifischen Sonden des SONDENSATZES 551.1 nach der Hybridisierung und nach der Behandlung mit der Nuklease für die drei Ansätze A) mit Nuklease und Detergens, B) mit Nuklease und C) mit 1x *Taq*-Puffer als Negativkontrolle. Die Fluoreszenzsignale wurden in diesem Fall mit einer PMT50 erfasst. Die Pfeile deuten die Reduktion der relativen Signale der Mismatchsonden in den Fällen A und B nach Behandlung mit der Nuclease an, während im Fall C eine ähnliche Diskriminierung beobachtet wurde.

Die absoluten und relativen Fluoreszenzintensitäten der allelspezifischen Sonden des Sondensatzes 551.1 sind in Abbildung 3-58 dargestellt. Für die vier Sonden, die sich nur in ihrer zentralen Base unterschieden, konnte wie bei den Kontrollsonden ein deutlicher Signalverlust bei den absoluten Intensitäten nachgewiesen werden (in den Ansätzen A und B zwischen 55 % und 85 %, für den Ansatz C zwischen 27 % und 40 %). Der entscheidende Unterschied war in den relativen Intensitäten zu finden, die auf das Signal von Sonde G als PM normiert wurden. Durch die zusätzliche Inkubation mit der Nuklease (mit oder ohne Detergens) im Vergleich zum Kontrollexperiment wurde eine deutliche Verbesserung der Diskriminierung beobachtet. Für die Kombination der Fehlpaarung A-C wurde die relative Intensität A) von 64,5 % auf 39,5 %, B) von 73,8 % auf 48,0 % und C) von 56,3 % auf 51,2 % reduziert. Für die Fehlpaarung C-C wurde eine Erniedrigung A) von 45,1 % auf 17,1 %, B) von 44,7 % auf 16,3 % und C) von 47,1 % auf 38,4 % beobachtet. Schließlich wurde für die Fehlpaarung T-C eine Reduktion der relativen Intensität A) von 53,6 % auf 28,5 %, B) von 51,5 % auf 28,6 % und C) von 61,6 % auf 55,7 % berechnet. Diese Werte zeigten eindeutig, dass die Nuklease eine Spezifität für Fehlpaarungen aufwies.

Die Nettosignalreduktion der absoluten Signale ist in Abbildung 3-59 abgebildet. Für die korrekte Paarung des Homoduplexes G-C wurde ein nSR von A) 30,9 % und B) 28,0 % errechnet; der nSR wurde für die Fehlpaarungen A-C mit A) 39,5 % und B) 36,8 %, für C-C mit A) 43,5 % und B) 43,4 % und schließlich für T-C mit A) 43,3 % und B) 40,7 % berechnet. Wiederum zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Ansätzen A und B, so dass davon aufgegangen werden konnte, dass das Detergens für eine verbesserte Diskriminierung nicht benötigt wurde. Diese Daten verdeutlichten fernerhin eine höhere Aktivität des Enzyms für Fehlpaarungen im Vergleich zu der G-C-Paarung; jedoch konnte auch eine Aktivität für Homoduplexe wie der positiven Hybridisierungskontrolle (vgl. Abbildung 3-57) gezeigt werden.

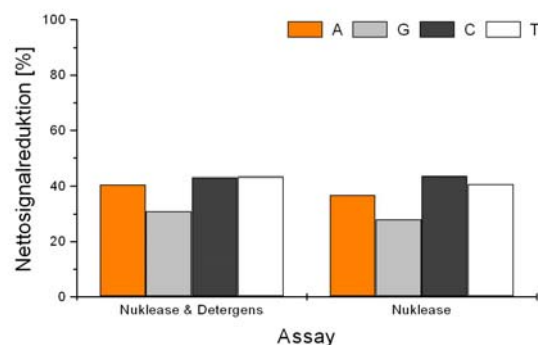


Abbildung 3-59: Nettosignalreduktion der Fluoreszenzsignale der allelspezifischen Sonden nach der Behandlung mit der Nuklease mit und ohne Detergens.

3.5.3. Fazit

Die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts zeigten erstmals die Verwendung der mismatchespezifischen Aktivität der Surveyor Nuclease für eine verbesserte Diskriminierung zwischen Perfect Match- und Mismatchsonden auf einem Microarray, hier anhand von cytosinhaltigen Heteroduplexen. Dieser Ansatz ermöglicht zukünftige Untersuchungen, die schlussendlich zu einer erhöhten Spezifität von diagnostischen DNA-Microarrays führen können.

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollten drei grundsätzliche Ziele verfolgt werden:

1. Die Entwicklung eines Microarrays zur Detektion der häufigsten Mutationen in *fimH*, die potentiell pathoadaptiv sind und damit das Pathogenitätspotential der jeweiligen *E. coli*-Variante erhöhen können.
2. Die Weiterentwicklung und Integration eines bereits etablierten *gyrA*-Microarrays zur Detektion der relevanten Mutationen in *gyrA*, die als genetischer Marker zur Detektion einer Fluorchinolonresistenz in *E. coli* verwendet werden können.
3. Die Untersuchung einer möglichen verbesserten Genotypisierung mit Hilfe einer mismatchspezifischen Nuklease.

Sowohl der *fimH*-Microarray als auch der kombinierte *fimH/gyrA*-Microarray wurden erfolgreich validiert und mit 131 bzw. 141 verschiedenen Isolaten getestet. Der mögliche Einsatz der mismatchspezifischen Nuklease konnte dagegen bislang nur ansatzweise anhand einer künstlichen Ziel-DNA gezeigt werden.

Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit in den aktuellen Stand der Wissenschaft eingeordnet und detailliert diskutiert.

4.1. Klinische Relevanz der verwendeten Sonden

Für zwei *fimH*-Positionen konnte bisher ein direkter Zusammenhang zwischen der *fimH*-Mutation und klinischen Symptomen beim entsprechenden Wirt hergestellt werden: für die Mutation S62A, die mit MNEC-Isolaten in Verbindung gebracht wurde (Pouttu et al. 1999), und die für enterohämorrhagische Stämme mit dem Serotyp O157:H7 spezifische Mutation N135K (Perna et al. 2001). Beide Varianten konnten in dieser Arbeit erfolgreich validiert und in den betreffenden Stämmen RS218 und IHE3034 bzw. EDL933 nachgewiesen werden.

Nach wie vor ist jedoch unklar, welche expliziten Auswirkungen die einzelnen *fimH*-Mutationen auf das Bindeverhalten der Typ1-Fimbrien vor allem der ExPEC-Isolate haben. Dafür werden *in vitro*-Bindungsstudien der unterschiedlichen *fimH*-Varianten benötigt. Da die meisten dieser pathoadaptiven Mutationen nicht in der Bindetasche des Moleküls, sondern am unteren Ende der Lektin-Untereinheit liegen (Schembri et al. 2000), kann vermutet werden, dass diese Mutationen über weitreichende Wechselwirkungen das Bindeverhalten ändern. Bis auf die genannten, für MNEC und Serotyp O157:H7 spezifischen Mutationen kann der *fimH*-Microarray daher nicht für eine eindeutige klinische Diagnostik verwendet werden. Es kann lediglich eine Aussage getroffen werden, ob eine potentiell pathoadaptive Mutation in einem Isolat auftritt oder nicht.

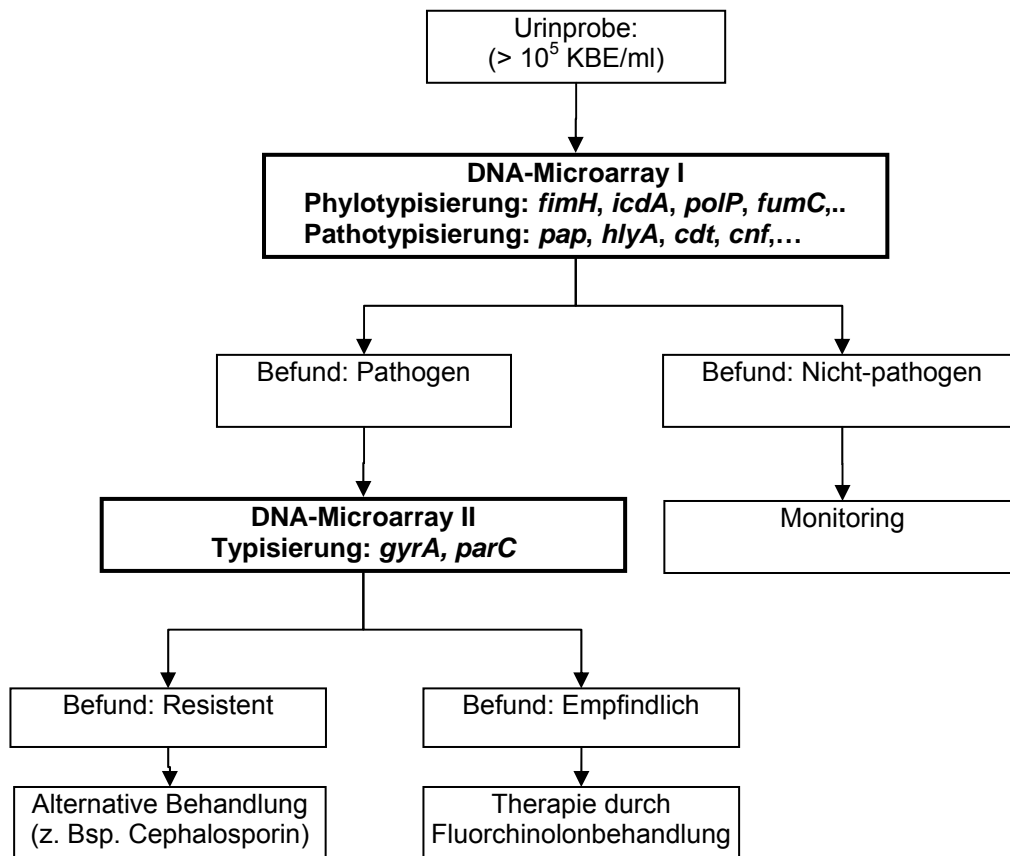


Abbildung 4-1: Übersicht über einen möglichen Einsatz eines integrierten Microarrays zur gleichzeitigen Detektion von Pathogenitäts- und Resistenzeigenschaften in der POC-Anwendung. Dabei kann bei einer Infektion mit einem pathogenen Stamm eine gezielte Empfehlung für eine geeignete Antibiotikatherapie ausgesprochen werden.

Für die klinische Diagnostik wären zusätzliche Zielgene, deren Genotypisierung eine eindeutige Einordnung in die ECOR-Gruppen ermöglicht („Phylotypisierung“) (Hommais et al. 2005; Wirth et al. 2006) sowie zusätzliche Informationen über die Pathogenität des betreffenden Stammes („Pathotypisierung“) (Dobrindt et al. 2003; Kaper et al. 2004) durch den Nachweis von bestimmten Virulenzgenen interessant (Abbildung 4-1).

Dagegen ist die Detektion von *gyrA*-Mutationen mit einem Microarray von klinischem Interesse, da dadurch eine mögliche Resistenz von *E. coli* gegenüber Fluorchinolonen schneller als mit etablierten kulturbasierten Methoden diagnostiziert werden kann. Dies ermöglicht eine beschleunigte und adäquate Therapie, senkt die Kosten der Behandlung, vermindert medizinische Komplikationen und kann die Sterberate von betroffenen Patienten reduzieren (Niederman 2001). Tatsächlich konnten in dieser Arbeit in insgesamt 30 der 141 untersuchten Isolate mindestens eine rezistenzauslösende Mutation an den Positionen 83 oder/und 87 nachgewiesen werden. Für die sechs klinischen Isolate UR888, UR947, UR1013, UR1365, UR1469 und UR1520 wurde bereits eine phänotypische Resistenz nachgewiesen (Klaus Schröppel, persönliche Mitteilung). Außerdem konnte in einer anderen Studie in den Isolaten der Serotypen O101:H⁻, O102:H6, O2:H42 und O153:H31 eine Resistenz

gegenüber Ciprofloxacin und Levofloxacin nach NCCLS-Norm nachgewiesen werden (Sompolinsky et al. 2005).

Zahlreiche phänotypische Untersuchungen haben den Einfluss einzelner Mutationen in der *gyrA*-QRDR auf die jeweilige MHK bestimmt. Dabei wurden jedoch oftmals unterschiedliche Methoden wie Agardilution, Agardiffusion oder Bouillondilution verwendet (Friedman et al. 2001; Ozeki et al. 1997; Webber und Piddock 2001; Yoshida et al. 1990); weiterhin wurden meist klinische Isolate untersucht, die hinsichtlich verschiedener Mutationen außerhalb von *gyrA* (z.B. *acrR*, *marR* o.ä.) nicht charakterisiert sind (P. Heisig, persönliche Mitteilung). In einer Studie an isogenen Stämmen konnte dagegen erstmals der direkte Einfluss einzelner Punktmutationen in *gyrA* und *parC* bestimmt werden. Demnach hat die *GyrA*-Mutation S83L den größten Einfluss auf die Fluorchinolonresistenz, während die phänotypische Expression von *parC*-Mutationen von mindestens einer *gyrA*-Mutation abhängig ist. Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit fünf verschiedene rezistenzauslösende Mutationskombinationen identifiziert werden (S83L, D87N, S83L/D87Y, S83L/D87N und S83L/D83G), die allesamt zuvor beschrieben wurden und die jeweils zu einer deutlichen Erhöhung des MHKs im Bouillondilutionsassay von 0,015 bis zu 0,25 µg - 1 µg Ciprofloxacin/ml führen (Bagel et al. 1999). Jedoch wird erst bei einer MHK von 4 µg/ml von einer klinisch relevanten Resistenz gesprochen (Paul-Ehrlich-Gesellschaft; <http://www.p-e-g.org>); deswegen müssten für den diagnostischen Einsatz weitere Zielgene wie spezifische Mutationen in den QRDRs der Zielgene *gyrB*, *parC* und *parD* sowie das Vorhandensein anderer Resistenzmechanismen, die in 1.5 beschrieben wurden, integriert werden. Jedoch kann durch den *gyrA*-Microarray eine potentielle Resistenz nachgewiesen werden, da diese offensichtlich den ersten Schritt einer stufenweisen Akkumulation von Mechanismen darstellen, die zu einer klinisch relevanten Resistenz führen können.

Dagegen konnten in den 72 Stämmen der ECOR-Sammlung keine Missensemutationen in der *gyrA*-QRDR gefunden werden, die zu einer potentiellen klinischen Resistenz führen können. Diese Stammsammlung wurde 1982 und damit vor der Einführung des ersten Fluorchinolons (Norfloxacin) auf dem Weltmarkt im Jahr 1986 (Hedenmalm und Spigset 1996) etabliert. Dies zeigt zum einen, dass in der Natur keine angelegten Resistenzen gegenüber rein synthetischen Antibiotika wie den Chinolonen vorkommen. Zum anderen beweist dies, dass die bereits etablierten Chinolone der ersten Generation wie Nalixidinsäure, die als Antibiotikum bereits 1962 eingeführt wurde (Oliphant und Green 2002), offensichtlich keinen ausreichenden Evolutionsdruck auf *Escherichia coli* ausgeübt hatten, um eine Resistenz auszubilden. Schließlich unterstreichen diese Ergebnisse die Daten der Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (Abbildung 1-4), die in *Escherichia coli* erst ab 1995 eine Resistenz gegenüber Chinolonen feststellen konnten. Fluorchinolone haben mittlerweile die traditionell verabreichten Sulfa-Antibiotika als Antibiotika der Wahl (48 % gegenüber 33 %) bei Harnwegsinfektionen abgelöst (Kallen et al. 2006). Dies erklärt den hohen Selektionsdruck auf sensitive Erreger, der zu den relevanten Mutationen in der *gyrA*-QRDR führt.

4.2. Phylogenetische Relevanz der untersuchten Positionen

4.2.1. Überblick über identifizierte *fimH*-Mutationen

Bei der Untersuchung der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden neben zahlreichen stillen Mutationen alleine 51 verschiedene polymorphe Positionen gefunden, die zu einem Aminosäureaustausch in dem Genprodukt führen und damit bei der Entwicklung dieses Arrays hätten berücksichtigt werden können; für weitere beschriebene Mutationen aus verschiedenen Publikationen (Harris et al. 2001; Hung et al. 2002; Schembri et al. 2000; Schembri et al. 2001a; Sokurenko et al. 1995; Sokurenko et al. 2004; Weissman et al. 2006) trifft das Gleiche zu. Jedoch wurden nicht zuletzt aus Kostengründen, aber auch wegen mangelnder Relevanz und Häufigkeit bei der Entwicklung des *fimH*-Microarrays lediglich 26 Mutationen in *fimH* berücksichtigt, die in den veröffentlichten Sequenzen und diversen Publikationen mehr als einmal gefunden bzw. durch eigene Sequenzierungen ermittelt wurden.

Wie in dem Vergleich der beiden Sequenzanalysen zu sehen (Abbildung 3-34) ist, konnten durch die Analyse der Blindproben zahlreiche neue polymorphe Positionen entdeckt oder Mutationen bestätigt werden, die aber aufgrund mangelnder Relevanz für das Sondendesign vernachlässigt wurden. Aufgrund des technologischen Ansatzes können jedoch nur bereits bekannte Mutationen nachgewiesen werden, was ein Nachteil gegenüber der herkömmlichen Sequenzierung des ganzen Gens ist. Unter der Annahme, dass einige Mutationen aufgrund ihres seltenen Vorkommens zumindest für die phylogenetische Typisierung nicht ausreichend relevant sind, kann man sich auf eine begrenzte Anzahl an bekannten Positionen beschränken. Tatsächlich konnten in den in dieser Arbeit verwendeten 136 *fimH*-positiven Isolaten nur 21 verschiedene Mutationen identifiziert werden, davon 16 durch Hybridisierung und fünf (P102S, V106A, E117K, V163I und V163F) zusätzlich durch Sequenzierung der *fimH*-Varianten, wobei nur E117K zuvor beschrieben wurde. Insgesamt zehn Mutationen, die auf dem Array berücksichtigt wurden, konnten in den Isolaten nicht identifiziert und somit auch nicht validiert werden (T9A, N33H, I42T, G66D, N70H, G73E, K76E, P111L, V118L und R166C). Insgesamt konnten neben den fünf durch Sequenzierung entdeckten Mutationen vier weitere Polymorphismen jeweils einmal nachgewiesen werden (V27T, G159S, N135K und Y195F). Diesen Mutationen konnte folglich zumindest eine untergeordnete Rolle in der Phylogenie zugeschrieben werden, was im Sequenzalignment bestätigt wurde.

4.2.2. Spezifität einzelner *fimH*-Sonden

Wie oben bereits erwähnt, konnten die MNEC- bzw. Serotyp O157:H7-spezifischen Mutationen in den relevanten Stämmen nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit neu entdeckte Mutation Q41K wurde in allen 14 Isolaten des Serotyps O153:H31 nachgewiesen; dies und die Tatsache, dass diese Isolate den gleichen *fimH*-Genotyp (Abbildung 3-33) und die selben Mutationen in *gyrA* haben, lässt vermuten, dass es sich um das identische Isolat handelt; jedoch wurden für die 14 Isolate unterschiedliche Pathotypen identifiziert (U. Dobrindt, persönliche Mitteilung). Für die anderen HWI-Isolate sowie für die asymptomatischen *E. coli*-Varianten konnten keine weiteren spezifischen Mutationen zugewiesen werden.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der identifizierten FimH-Mutationen in Abhängigkeit von der phylogenetischen Gruppe des entsprechenden Isolats; mögliche spezifische Mutationen sind hervorgehoben.

Mutation	A	B1	B2	D	E	Summe
-	8	4	9	1	1	23
V27A	21	30	36	17	3	107
V27T	-	-	1	-	-	1
Q41K	-	14	-	-	-	14
S62A	-	-	2	-	-	2
G66C	-	-	1	6	-	7
G66S	2	-	7	-	-	9
N70S	-	-	31	-	-	31
T74I	-	-	2	-	-	2
S78N	-	-	33	-	-	33
A119V	8	4	-	2	-	14
N135K	1	-	-	-	-	1
G159S	-	-	1	-	-	1
V163A	-	-	2	-	-	2
R166H	-	-	3	-	-	3
Y195F	1	-	-	-	-	1
A202V	7	-	-	-	-	7
Summe	48	52	128	26	4	258

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der identifizierten Muster an FimH-Mutationen in Abhängigkeit von der phylogenetischen Gruppe des entsprechenden Isolats; mögliche spezifische Mutationsmuster sind hervorgehoben.

Mutationsmuster	A	B1	B2	D	E	Summe
-	8	4	9	1	1	23
V27A	4	12	-	9	3	28
V27A/A119V	8	4	-	2	-	14
V27A/A202V	5	-	-	-	-	5
V27A/G66S/A202V	2	-	-	-	-	2
V27A/Y195F	1	-	-	-	-	1
V27A/N135K	1	-	-	-	-	1
V27A/Q41K	-	14	-	-	-	14
V27A/N70S/S78N	-	-	15	-	-	15
V27T/N70S/S78N	-	-	1	-	-	1
V27A/S78N	-	-	2	-	-	2
V27A/N70S/S78N/G159S	-	-	1	-	-	1
V27A/N70S/S78N/G66C	-	-	1	-	-	1
V27A/N70S/S78N/G66S	-	-	7	-	-	7
V27A/N70S/S78N/S62A	-	-	2	-	-	2
V27A/N70S/S78N/T74I	-	-	2	-	-	2
V27A/N70S/S78N/V163A	-	-	2	-	-	2
V27A/R166H	-	-	3	-	-	3
V27A/G66C	-	-	-	6	-	6
Summe	29	34	45	18	4	130

Vielmehr drängt sich nach den erzielten Ergebnissen ein Zusammenhang zwischen bestimmten Mutationen bzw. Mutationsmustern und der phylogenetischen Abstammung des entsprechenden Isolats auf (Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2). Dabei konnte für die Gruppe A, die sich hauptsächlich aus kommensalischen Varianten zusammensetzt, eindeutig die „kommensal-adaptive“ Mutation A202V nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit für Gruppe D identifizierte Kombination V27A / G66C wurde jedoch bereits auch in Isolaten der Gruppe B2 nachgewiesen (Hommais et al. 2003). Jedoch konnten anhand der phylogenetischen Untersuchung der *fimH*-Varianten für diese Gruppe mit den Mutationen N70S, S78N und R166H spezifische Mutationen mit einer hohen Relevanz identifiziert werden, die in keinem Widerspruch zu anderen veröffentlichten Ergebnissen stehen. Interessanterweise konnte in keinem der B2-Isolate V27A als einzige Mutation gefunden werden; diese häufigste Mutation überhaupt wurde in dieser Gruppe immer in Kombination mit anderen Mutationen nachgewiesen. Tatsächlich konnte für die Wildtypvariante 27V ein pathoadaptives Potential nachgewiesen werden (Hommais et al. 2003); dieses Muster wurde in dieser Arbeit in allen phylogenetischen Gruppen identifiziert.

4.2.3. Spezifität von *gyrA*-Mutationen

Die Sequenzierung der *gyrA*-Varianten der insgesamt 141 Proben ergab, dass im Laufe des Sondendesigns sowohl alle relevanten Mutationen (Positionen 248, 259 und 260), die zu einem Aminosäureaustausch führen, als auch alle relevanten stillen Mutationen (Position 255) im Bereich der Sonden erfasst wurden. Alle anderen Mutationen, die in Datenbanken veröffentlicht oder durch diverse Publikationen beschrieben wurden (Chen und Lo 2003; Conrad et al. 1996; Ruiz 2003; Vila et al. 1994; Yoshida et al. 1990), konnten in den Isolaten nicht gefunden werden. Die stille Mutation an Position 252 wurde lediglich in dem Stamm EDL933 gefunden und spielt daher nur eine untergeordnete Rolle. Diese Ergebnisse entsprechen außerdem anderen systematischen Studien über resistente Isolate, bei denen ebenfalls keine weiteren Mutationen in der *gyrA*-QRDR gefunden wurden (Lehn et al. 1996; Yu et al. 2004). Folglich braucht der *gyrA*-Subarray auch nicht um weitere Positionen erweitert werden; statt dessen erwies sich die Reduktion des Arrays im Vergleich zu dem bereits etablierten *gyrA*-Microarray (Yu et al. 2004) von 40 auf 24 allelspezifischen Sonden als erfolgreich und aus Gründen eines reduktionistischen Ansatzes für eine spätere Integration in einer μ TAS-Apparatur (Liu et al. 2004) als sinnvoll.

Bei näherer Betrachtung der Verteilung der *gyrA*-Mutationen innerhalb der phylogenetischen Gruppen der 61 untersuchten Proben konnte kein Zusammenhang festgestellt werden; in den vier Gruppen A, B1, B2 und D konnte mindestens jeweils eine Probe mit mindestens einer resistenzauslösenden Mutation an den Positionen 248, 259 und 260 gefunden werden (Tabelle 4-3). Damit konnten Ergebnisse, die vermuten lassen, dass resistente Stämme oft weniger pathogen als sensitive Stämme sind (Martinez-Martinez et al. 1999; Velasco et al. 2001; Vila et al. 2002), nicht bestätigt werden.

Tabelle 4-3: Häufigkeit der unterschiedlichen Mutationsmuster in den 61 Isolaten in Abhängigkeit von der phylogenetischen Gruppe des jeweiligen Isolats.

Mutation	A	B1	B2	D	Summe
-	5	4	26	3	38
83L	-	-	2	-	2
87N	-	14	-	-	14
83L, 87Y	2	-	1	3	6
83L, 87N	-	-	1	-	1
Summe	7	18	30	6	61

Interessanterweise wurde die stille Mutation 255 C → T in allen phylogenetischen Gruppen der 61 Proben und der 72 Stämme der ECOR-Sammlung gefunden, während die Wildtypvariante 255C nur in der Gruppe A gefunden wurde (Tabelle 4-4); somit kann die Position 255 als spezifischer Marker für diese Gruppe betrachtet werden.

Tabelle 4-4: Häufigkeit der Wildtypvariante und der stillen Mutation an Position 255 in Abhängigkeit von den phylogenetischen Gruppen aller 133 in dieser Arbeit untersuchten Isolate.

Mutation	A	B1	B2	D	E	Summe
255C = WT	25	-	-	-	-	25
255T = stille Mutation	7	34	45	18	4	107
Summe	32	34	45	18	4	133

4.2.4. Bestimmung der phylogenetischen Zugehörigkeit

Die diskutierten Ergebnisse deuten an, dass mehrere in dieser Arbeit entwickelte Sonden das Potential haben, als Marker für die phylogenetische Einteilung und damit zur Einschätzung der Pathogenität des betreffenden Isolates verwendet zu werden. Tatsächlich konnte ein Zusammenhang zwischen der Virulenz eines Isolats und der Zugehörigkeit zu einer bestimmten phylogenetischen Gruppe nachgewiesen werden (Picard et al. 1999). Danach gehören in erste Linie Stämme der Gruppe B2 und mit Abstrichen der Gruppe D zu den pathogenen Variaten, während in der Gruppe A und auch in der Gruppe B1 vor allem kommensalische Varianten zu finden sind. Die Identifizierung der Gruppenzugehörigkeit wird bislang standardmäßig durch einen schnellen Nachweis der drei genomischen DNA-Fragmente *chuA* (ein Virulenzgen, das für einen Hämrezeptor kodiert), *yjaA* (kodiert für ein hypothetisches Protein YjaA) und des nicht näher beschriebenen DNA-Fragmentes TspE4.C2 durch PCR durchgeführt, wie in Abbildung 4-2 dargestellt ist (Clermont et al. 2000). Diese Methode ist jedoch sehr anfällig für falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Rekombinationen und auch aufgrund von Kontaminationen in einer Probe, da lediglich die An- bzw. Abwesenheit eines Gens untersucht wird. Ein weiterer Nachteil ist, dass dadurch keine Mischpopulationen aufgelöst werden können. Schließlich kann der bloße Nachweis eines Gens keinen Einblick in tiefere phylogenetische Zusammenhänge liefern, wie es einzelne Mutationen ermöglichen.

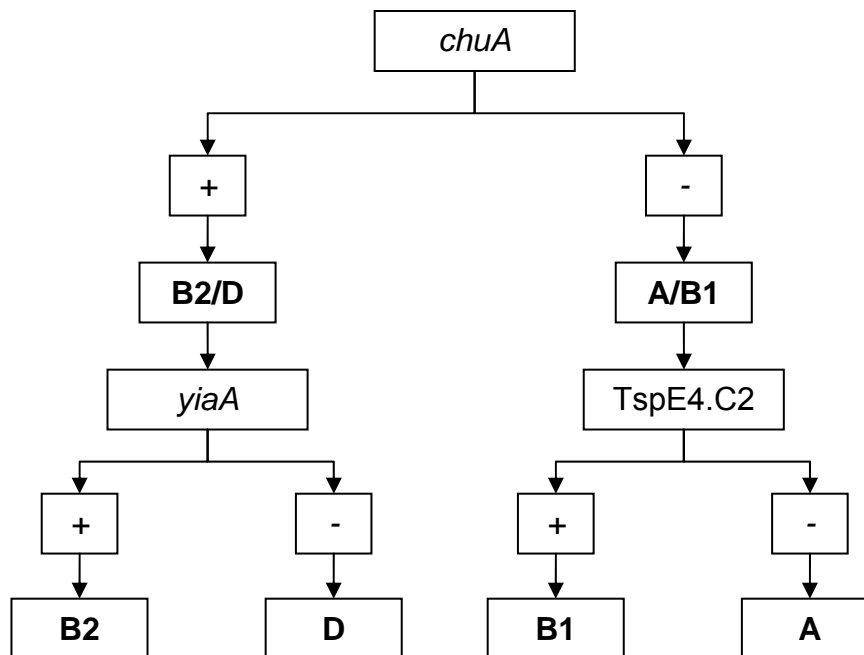


Abbildung 4-2: Entscheidungsbaum zur Einteilung von *E. coli*-Isolaten in die phylogenetischen Gruppen A, B1, B2 und D in Abhängigkeit von der Amplifizierung von drei Genen (Clermont et al. 2000).

Eine zeit- und kostenintensive Methode für die phylogenetische Analyse ist die MLST, die heutzutage als Goldstandard verwendet wird (Urwin und Maiden 2003), jedoch sehr zeit- und kostenintensiv sind. Dazu müssen die sieben Strukturgene *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* und *recA* komplett sequenziert werden. Einen interessanten Ansatz liefern Hommais und Mitarbeiter mit einer Methode, bei der lediglich 13 SNPs in den fünf Genen *trpA*, *trpB*, *putP*, *icdA* und *polB* untersucht werden (Hommais et al. 2005). Dieses Format kann ohne weiteres auf die in dieser Arbeit verwendete Plattform der allelspezifischen Hybridisierung übertragen werden, die prinzipiell in der Lage ist, Mischungen in geringem Umfang aufzulösen, wobei darin auch der Einfluss von möglichen Kontaminationen in geringer Konzentration minimal ist. Tatsächlich sind für diese fünf essentiellen Gene, die in jeder *E. coli*-Variante gefunden werden können, jeweils zwischen 120 und 220 Nukleotidsequenzen veröffentlicht, die eine robuste Sequenzanalyse versprechen. Diese Ansätze, nach denen Polymorphismen in Strukturgenen erfolgreich zur phylogenetischen Einteilung von *Escherichia coli* verwendet werden, verdeutlichen, dass einzelne Mutationen in *fimH* wie oben diskutiert ebenso dafür verwendet werden bzw. als Ergänzung dabei dienen können.

Wie bereits aus dem phylogenetischen Baum aller *fimH*-Varianten abzuleiten ist, treten insbesondere bei B2-Stämmen vermehrt Missensemutationen, zusätzlich aber auch stille Mutationen auf. Dies ist in Abbildung 4-3 noch einmal verdeutlicht, in der die absoluten Häufigkeiten an Mutationen in den sequenzierten Bereichen 76 bis 707 in Abhängigkeit von der phylogenetischen Gruppe dargestellt sind. Darin wird deutlich, dass lediglich in Gruppe B2 mehr als zwölf Mutationen vorzufinden sind (maximal: 23, entspricht $23/632 = 3,6\%$), während der Großteil der Stämme der Gruppe A vier bis sieben und der Stämme B1 und D acht bis elf Mutationen in ihrer jeweiligen *fimH*-Variante haben. Tatsächlich konnte dieses Phänomen bereits für andere Strukturgene wie beispielsweise den Genen, die routinemäßig bei der MLST

untersucht werden, festgestellt werden (Wirth et al. 2006). Dabei wurden für diese Gene deutlich höhere Raten nachgewiesen (8 bis 20 %). Nach diesem Ansatz hat sich die Mutationsrate bei pathogenen Linien in der Evolution erhöht, was durch die erhöhte Anzahl sowohl von stillen als auch von Missensemutationen gezeigt werden kann.

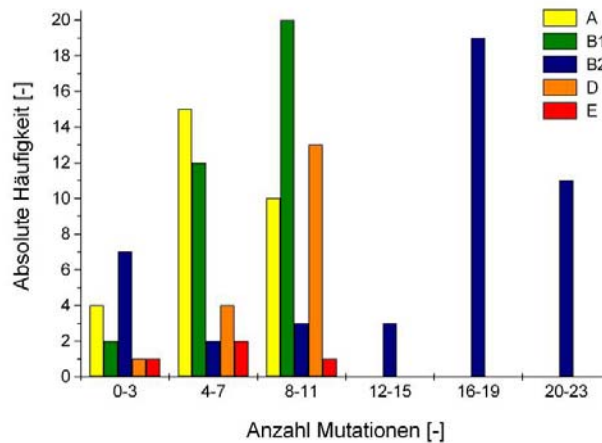


Abbildung 4-3: Absolute Häufigkeit der Anzahl an Mutationen (Missensemutationen und stille Mutationen) in den 130 *fimH*-Varianten in Abhängigkeit von der jeweiligen phylogenetischen Gruppe des entsprechenden Isolats.

4.2.5. *fimH*:IS 1-Element

In der *fimH*-Variante von ECOR6 wurde durch Sequenzierung zweifelsfrei ein IS1-Element identifiziert. Dieses gehört zu einer vielseitigen Gruppe von kleinen mobilen Elementen (< 2,5 kbp), die sich durch eine einfache genetische Organisation auszeichnen und die an verschiedenen Stellen innerhalb einer Ziel-DNA inserieren können. Handelt es sich dabei um ein funktionelles Gen wie *fimH*, wird dieses durch Insertion deaktiviert. Dabei kodieren diese Elemente im Allgemeinen für kein

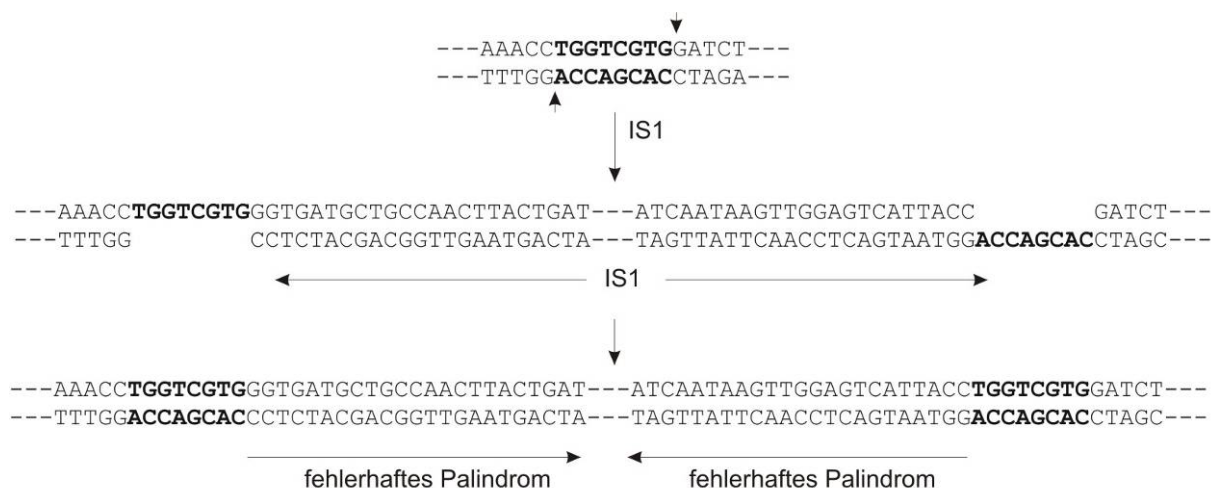


Abbildung 4-4: IS1-Insertion in ECOR6-*fimH*. Die IS1-kodierte TnpA verursacht einen Bruch in der Ziel-DNA mit versetzten Enden, so dass das IS1-Element inserieren kann und die Einzelstrangabschnitte durch Neusynthese wiederaufgefüllt werden, die in den beschriebenen duplizierten Sequenzen (hervorgehoben) resultieren. Erwähnenswert sind die charakteristischen fehlerhaften Palindrome an den IS1-Enden, die bei der Insertion bzw. Entfernung beteiligt sind (adaptiert nach (Lengeler et al. 1999)).

weiteres Produkt außer für die Transposase TnpA (bei den meisten Varianten eine Kopie, im IS1-Element: zwei Kopien). Diese interagiert *cis* während der Transposition mit den invertierten Enden, die fehlerhafte Palindromsequenzen darstellen. Transposasen generieren dabei an den Schnittstellen im Zielgen eine kurze Sequenzduplikation zwischen acht und elf Basen (Lengeler et al. 1999), was für die *fimH*-Variante von ECOR6 in Abbildung 4-4 veranschaulicht ist.

Natürliche *E. coli*-Isolate sind sowohl für das Vorhandensein als auch für die Anzahl dieser Insertionssequenzen polymorph. So liegen innerhalb der 72 Stämme der ECOR-Stammsammlung durchschnittlich 7,2, 2,9 und 1,9 Kopien von IS1-, IS2- und IS3-Elementen vor, die sowohl chromosomal- als auch plasmidkodiert sind. Dabei wurde bei den IS1-Elementen die höchste Varianz festgestellt: Während in 11 ECOR-Stämmen keine Kopie nachgewiesen werden konnte, wurden in 17 Isolaten zwischen elf und 27 Kopien identifiziert (Sawyer et al. 1987); dabei sind diese Kopien nicht zufällig über die genomische DNA verteilt, sondern oftmals in bestimmten Regionen wie der „origin of replication“ (zwischen 76 und 92 min) lokalisiert. Tatsächlich liegt der *fim*-Gencluster in den acht komplett sequenzierten *E. coli* Stämmen W3110, MG1655, CFT073, 536, EDL933, Sakai, O1 und UTI89 im Bereich 98 min der genomischen DNA; in dieser Region wurde für die Stämme ECOR6, ECOR25, ECOR35, ECOR37, ECOR49 und ECOR50 ein IS1-Element nachgewiesen (Boyd und Hartl 1997). Zusätzlich sind IS1-Kopien in weiteren Loci bekannt, die für Virulenzfaktoren und speziell für Adhäsine kodieren, wie *csv*, *fae*, *fap*, *afa* und *pap* (Boyd und Hartl 1997). Schließlich wurde bereits für *fimE*, der regulatorischen Untereinheit der Typ 1-Fimbrien-Expression, eine IS1-Insertion nachgewiesen (Blomfield et al. 1991). Ob diese Assoziation eine generelle Eigenschaft von IS1 ist, kann nicht geklärt werden; jedoch wird hinter dem horizontalen Gentransfer die treibende Kraft hinter der Evolution von Genclustern in Bakterien vermutet, besonders von nichtessentiellen Funktionen wie der Virulenz (Lawrence und Roth 1996).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit neu beschriebene *fimH*:IS1-Sequenz kein außergewöhnliches Phänomen, sondern lediglich eine weitere Variante des horizontalen Gentransfers von mobilen genetischen Elementen darstellt, die in vielfältiger Weise in allen Organismen vorkommen (Mahillon und Chandler 1998). So sind in der Datenbank IS-Finder (Siguiet et al. 2006) etwa 20 Familien an verschiedenen IS-Elementen veröffentlicht (Stand: Juni 2007), die in den unterschiedlichsten Bakterien identifiziert wurden (<http://www-is.biotoul.fr/>).

4.3. Leistungsmerkmale des Microarrays

4.3.1. Reduktion der Assayzeit

Ein offensichtlicher Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten allelspezifischen Hybridisierung auf einem Microarray ist die deutliche Zeitersparnis gegenüber anderen Assays zur Genotypisierung bzw. zur phänotypischen Untersuchung der Fluorchinolonresistenz. Eine beschleunigte Diagnostik verspricht in der klinischen Anwendung eine schnellere Behandlung mit einem angemessenen Antibiotikum und

dadurch resultierend höhere Therapiechancen bei niedrigeren Kosten (Niederman 2001; Ramphal 2005).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Protokoll, das innerhalb von 3,5 h nach DNA-Extraktion durchgeführt werden konnte, das Potential hat, den korrekten *fimH*-Genotyp zu bestimmen. Dies ist im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten (Grimm et al. 2004; Leinberger et al. 2005; Yu et al. 2004) in erster Linie auf eine deutliche Reduktion der Amplifizierungsdauer durch ein auf ein 22 min gekürztes PCR-Programm zurück zu führen, das offensichtlich bei einer hohen Eingangsmenge ausreichend viel PCR-Produkt für die Hybridisierung liefert. Zusammen mit einer Isolierung von bakterieller DNA aus Urin (wie bspw. dem Urine Bacteria DNA Isolation Kit), für die nach Angaben des Herstellers (<http://www.norgenbiotek.com>) 45 Minuten gebraucht werden, kann somit eine vollständige Untersuchung der Probe in weniger als 4,5 h nach der Probennahme durchgeführt werden. Um eine allgemeingültige Aussage zu treffen, müssten noch niedrigere Eingangsmengen an genomischer DNA mit diesen Parametern untersucht werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit wie schon in anderen Studien zuvor gezeigt (Grimm et al. 2004), dass eine weitere Verkürzung der Hybridisierungsdauer zwar prinzipiell möglich ist, dies aber zu einer schlechteren Diskriminierung zwischen den allelischen Varianten führt. Die Proben sollten mit dem hier beschriebenen Assay mindestens eine Stunde lang hybridisiert werden, um eine robuste Unterscheidung der Fluoreszenzsignale und damit der verschiedenen Genotypen zu garantieren.

Zur weiteren Optimierung wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der unspezifische Verdau der Ziel-DNA, für den ca. 30 min Prozessdauer eingeräumt werden müssen, für die Hybridisierung notwendig ist. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass bei unverdauten PCR-Produkten die Signalintensitäten auf dem Microarray sehr stark in Abhängigkeit von der Sondenposition variieren. So wurden für Positionen, die das 5'-Ende des Gens abdecken, vergleichsweise niedrige Signale, für Sonden des 3'-Endes sehr hohe Intensitäten beobachtet, die die gleichzeitige Auswertung aller SONDENSÄTZE nicht ermöglichen (Abbildung 3-16).

Ein weiterer Ansatz zur Verkürzung der Gesamtprozesszeit könnte in der Reduktion der Waschschrte (insgesamt ebenfalls 30 min) liegen; dies wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In mehreren anderen Studien wurden jedoch bereits erfolgreich deutlich kürzere Waschprotokolle verwendet (Ballmer et al. 2007; Hamelin et al. 2007; Kostic et al. 2007; Wick et al. 2006).

4.3.2. Der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Signalintensität

In dieser Arbeit wurden grundlegende Untersuchungen durchgeführt, mit dem Ziel zu zeigen, welchen Einfluss verschiedene Eigenschaften der Ziel-DNA auf die Wechselwirkungen zwischen Sonde und Ziel-DNA haben. So konnte eindeutig gezeigt werden, dass erst die Fragmentierung des PCR-Produktes zu kurzen Doppelsträngen eine robuste Genotypisierung durch allelspezifische Sonden ermöglicht (Abbildung 3-16). In der Tat wurde dieses Phänomen in unabhängigen Studien beschrieben, in denen gezeigt werden konnte, dass bei doppelsträngiger

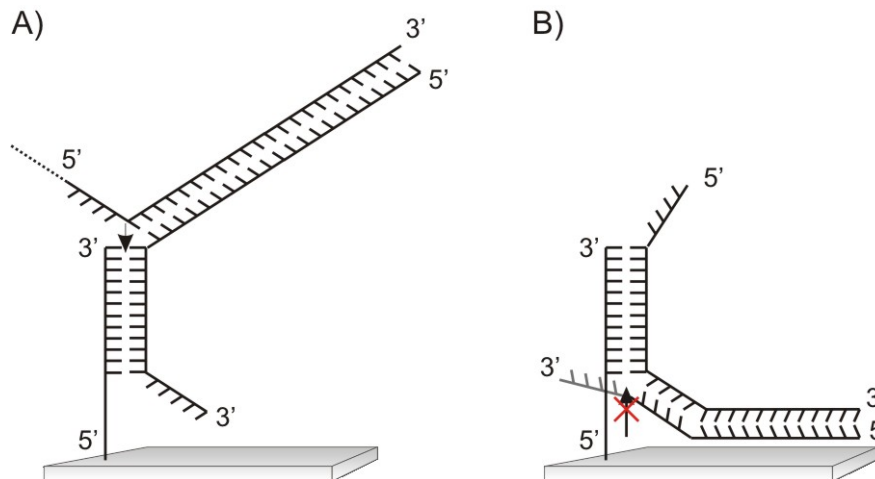


Abbildung 4-5: Wechselwirkungen zwischen immobilisierter Nukleotidsonde und doppelsträngiger Ziel-DNA. Während der Gegenstrang bei einem langen 5'-Überhang (A) zur Verdrängung der Sonde führt, ist dies bei einem langen 3'-Überhang (B) nicht der Fall, so dass hier eine höhere Hybridisierungseffizienz beobachtet werden kann (nach (Peytavi et al. 2005)).

Ziel-DNA ein langer 5'-Überhang (in Richtung der Lösung) zur Verdrängung einer kurzen Nukleotidsonde durch den Gegenstrang der DNA führt. Dieses Phänomen konnte für 3'-Überhänge (in Richtung der Oberfläche) nicht beobachtet werden (Abbildung 4-5). Daraus resultiert die Empfehlung, doppelsträngige DNA vor der Hybridisierung unspezifisch zu fragmentieren (Peytavi et al. 2005; Stedtfeld et al. 2007). Dieser Schritt hat den zusätzlichen Vorteil, dass komplexe Sekundärstrukturen innerhalb der Ziel-DNA vermieden werden.

Ein zweiter Aspekt, der in dieser Arbeit untersucht wurde, war der Einfluss der Einbaurrate des Fluoreszenzfarbstoffes Cy3 sowohl auf die absolute Signalintensität der Hybridisierung als auch auf die Diskriminierung zwischen PM- und MM-Sonden. Es ist nahe liegend, dass eine stärker markierte Ziel-DNA zu einer höheren absoluten Signalintensität und damit zu einer gesteigerten Sensitivität führt; dies konnte in Abschnitt 3.2.2 bestätigt werden. Jedoch hat eine höhere Einbaurrate keine signifikanten Auswirkungen auf die allelspezifische Diskriminierung; das bedeutet, dass sich die Hybridisierungseffizienz von stärker und von schwächer markierter Ziel-DNA in Bezug auf die Diskriminierung nicht unterscheidet.

Bei der allelspezifischen Hybridisierung macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass zentral gelegene Fehlpaarungen in der Sondensequenz das höchste Diskriminierungspotential haben (Guo et al. 1994). Deswegen werden die Sonden grundsätzlich so entwickelt, dass die kritischen Nukleotide in der Mitte der Sondensequenz liegen. In dieser Arbeit wurden innerhalb eines Sondensatzes unterschiedliche Diskriminierungen beobachtet, je nachdem, welche allelische Variante als Ziel-DNA vorlag. Dies konnte in den Fällen der Positionen 272 und 296 auf eine jeweils höhere Schmelztemperatur der Sonden mit Guenosin als zentralem Nukleotid zurückgeführt werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt, der in dieser Arbeit untersucht wurde, betrifft zusätzliche Fehlpaarungen in dem DNA-DNA-Hybrid. Künstliche Mismatches innerhalb der Sondensequenz wurden bereits verwendet, um ungünstige

Sekundärstrukturen innerhalb der Sonde zu vermeiden, die eine effiziente Hybridisierung stören würden (Lee et al. 2004). Letowski und Mitarbeiter konnten in erster Linie an GC-armen 50mer-Sonden zeigen, dass zusätzliche und tendenziell zentral gelegene Mismatches in einer Sonde einen stärkeren Einfluss auf die Hybridisierung haben als Mismatches, die am 3'- oder am 5'-Ende einer Sonde liegen (Letowski et al. 2004). In dieser Arbeit konnte dieses Phänomen für den umgekehrten Fall, nämlich für stille Mutationen in der Ziel-DNA, nachgewiesen werden: Je näher sich solch eine Fehlpaarung an einem kritischen Nukleotid befand, desto stärker wurde die Hybridisierung zwischen Sonde und Ziel-DNA unterbunden, was an der Reduktion der absoluten Signalintensität beobachtet werden konnte. Gerade bei der genotypischen Untersuchung von Strukturgenen, die für die Sequenztypisierung verwendet werden, kann eine große Anzahl von stillen Mutationen beobachtet werden. Im Fall von *gyrA* wurden nur zwei relevante stille Mutationen gefunden und für das Sondendesign berücksichtigt. Dagegen wurden die während der Sequenzanalyse für die Entwicklung des *fimH*-Microarrays identifizierten stillen Mutationen nicht berücksichtigt, weil deren große Anzahl zu einer deutlichen Erhöhung der Kosten für die Arrayherstellung geführt hätte. Jedoch hatten die meisten dieser stillen Mutationen keine Auswirkungen auf die Diskriminierung zwischen den allelischen Varianten. Für die meisten SONDENSÄTZE wurde trotz diverser stiller Mutationen in dem jeweilig abgedeckten Bereich eine vergleichbare relative Intensität gemessen. Nur für die stille Mutation an Position 246 konnte eine deutlich schlechtere Diskriminierung des SONDENSÄTZE 247 beobachtet werden. Dagegen wurden für die stillen Mutationen an den Positionen 184 und 546 signifikant niedrigere relative Intensitäten für die SONDENSÄTZE 188 bzw. 546 nachgewiesen (3.2.4). Diese Beobachtung unterstreicht, dass stille Mutationen im Allgemeinen nicht für die Arrayentwicklung berücksichtigt werden müssen, was zu einer Reduktion der Produktionskosten eines Arrays und zu einer deutlich einfacheren und schnelleren Auswertung der Fluoreszenzsignale führt.

4.3.3. Diskriminierung zwischen allelischen Varianten

Für die Genotypisierung mit Hilfe der allelspezifischen Diskriminierung ist es entscheidend, dass die allelischen Varianten eindeutig und reproduzierbar voneinander unterschieden werden können. Dabei spielen in erster Linie die Hybridisierungsbedingungen wie die Temperatur und die Hybridisierungsdauer eine entscheidende Rolle (Guo et al. 1994), was in 3.1.3 gezeigt wurde. Mit stringenteren Bedingungen konnten dabei deutlich spezifischere Ergebnisse erzielt werden. In Abbildung 4-6 ist beispielhaft die Verteilung aller relativer Intensitäten der *fimH*-MM-Sonden eines Experiments bei Standardbedingungen dargestellt, woraus ersichtlich wird, dass in diesem Fall für alle Fehlpaarungen ein $RI_{MM} < 60\%$ beobachtet werden konnte. Für die Sonden des *gyrA*-Microarrays wurde sogar eine deutlich bessere Diskriminierung berechnet.

Ein deutlicher Vorteil der allelspezifischen Hybridisierung gegenüber anderen Methoden, die lediglich bestimmte Gene nachweisen, liegt in dem Potential, Mischungen in der Ziel-DNA auflösen zu können. In dieser Arbeit konnte selbst bei einem 50-fachen Überschuss einer allelischen Variante die zweite Variante vom Hintergrund unterschieden werden. Die meisten Studien, die sich mit der

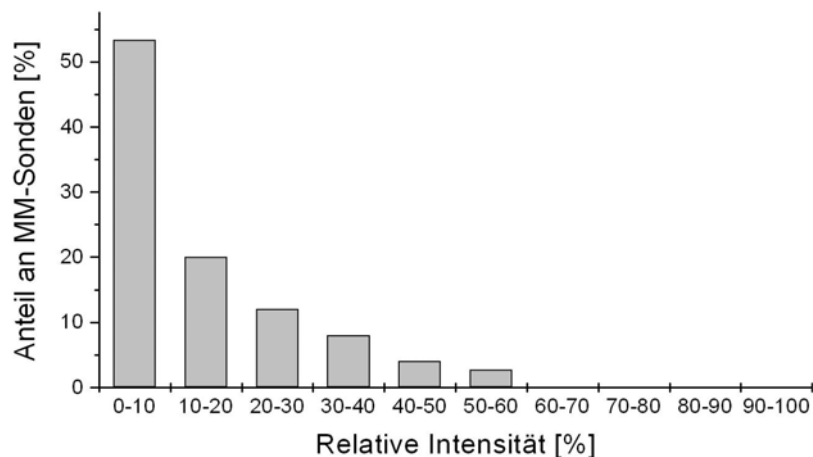


Abbildung 4-6: Verteilung der relativen Intensitäten für alle MM-Sonden eines Versuches mit der *fimH*-Variante des Referenzstammes MG1655.

Genotypisierung von Mischungen aus allelischen Varianten beschäftigen, untersuchen lediglich den Unterschied zwischen homozygoten (100 % Variante 1 oder 100 % Variante 2) und heterozygoten Genotypen (jeweils 50 % beider Varianten) (O'Meara et al. 2002; Pastinen et al. 1997; Sinclair et al. 2003; Takatsu et al. 2004). In der vorangegangenen Studie zur Entwicklung des *gyrA*-Microarrays konnte ein fluorochinolonresistentes Isolat bei einem 10fachen Überschuss eines sensitiven Isolates noch detektiert werden (Yu et al. 2007). Lindros und Mitarbeiter entwickelten ein System auf Basis eines Microarray-basierten Sequenzierungsassays, das die quantitative Bestimmung einer allelischen Frequenz zwischen 5 und 95 % in gemischten DNA-Proben ermöglichte (Lindroos et al. 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind somit in etwa mit denen anderer Publikationen vergleichbar.

Ein wichtiges Attribut eines jeden Assays ist seine Sensitivität. Dieser Begriff kann unter anderem definiert werden: (1) als absolute DNA-Menge, die für eine erfolgreiche Detektion benötigt wird, (2) als Verhältnis von mikrobieller DNA zu Hintergrund-DNA (z.B. genomische DNA des Wirtes) oder (3) als Verhältnis von Ziel-DNA zu Nicht-Ziel-DNA, was vor allem für die Erregerdiagnostik relevant ist (Kostic et al. 2007). In dieser Arbeit wurde die Sensitivität als die untere Nachweisgrenze der absoluten Menge an Eingangs-DNA definiert, die eine eindeutige Genotypisierung erlaubt. Dabei wurde die genomische DNA des Referenzstammes MG1655 stufenweise verdünnt und als Vorlage für den Amplifizierungsschritt eingesetzt. Die Kontrolle der PCR mit Hilfe eines Agarosegels, Färbung und Detektion mit Ethidiumbromid ergab eine untere Nachweisgrenze von 50 pg genomische DNA als Ausgangsmenge, was in etwa 10000 Genomäquivalenten entspricht. Dagegen konnte mit Hilfe des *fimH*-Microarrays gezeigt werden, dass 1000 Genomäquivalente für eine eindeutige Genotypisierung ausreichend sind (entspricht 5 pg an Ausgangs-DNA). Geringere Ausgangsmengen an DNA resultierten zwar in einigen signifikanten Signalen, die vom Hintergrund unterschieden werden konnten; jedoch war keine eindeutige Genotypisierung mehr möglich. Deswegen wurde die Sensitivität des Assays als 1000 Genomäquivalente definiert. Mit Hilfe des *gyrA*-Microarrays konnten dagegen sogar 100 CFU detektiert werden (Yu et al. 2007). Diese deutlich höhere

Sensitivität könnte auf das vergleichbar kleine *gyrA*-PCR-Produkt von 191 bp zurückgeführt werden (zum Vergleich: *fimH* ist mit 778 bp etwa viermal so groß).

4.4. Verbesserte Prozessierung der Daten

Die automatische Prozessierung der Signalintensitäten ist ein kritischer Punkt der Datenauswertung. In dieser Arbeit wurden verschiedene Algorithmen verglichen, die eine automatische Filterung von Spots ermöglichen, die sich durch eine nicht-akzeptable Spotmorphologie aufgrund von Verunreinigungen oder Spottingfehlern auszeichnen. Dieser Schritt macht eine visuelle Begutachtung überflüssig, die willkürlich, zeitintensiv und vor allem fehlerbehaftet ist (Sauer et al. 2005). Für die hier benutzte Plattform von verwendeten Objektträgern, Pins und Druckpuffern konnte ein CV_{Spot} -Wert von 0,4 als sinnvoller Cut-off-Wert bestimmt werden. Dieser kann jedoch nicht auf andere Ansätze übertragen werden, da sich die Spotmorphologien je nach verwendeten Materialien und Puffern unterscheiden (Sauer et al. 2005). So legten Sauer und Mitarbeiter einen $CV_{\text{Spot}} = 0,5$ für einen 0,1 N Carbonatpuffer auf ARChip UV-Objektträgern als Plattform fest.

Die anderen Parameter wie der Mittelwert-Median-Korrelationskoeffizient (Tran et al. 2002) oder die verschiedenen Qualitätsindizes (Sauer et al. 2005; Wang et al. 2001) lieferten in dieser Arbeit dagegen keine sinnvollen und robusten Ergebnisse. Dabei berücksichtigen die Qualitätsindizes weitaus mehr verfügbare Informationen als die gemittelten Signalintensitäten, die hier für die Auswertung der Daten verwendet wurden. Dazu gehören die Anzahl der Spotpixel, Informationen über die Hintergrundintensität, globale Intensitäten des gesamten Arrays und der Anteil an gesättigten Pixeln. Es scheint sinnvoll, einzelne dieser Parameter als zusätzliche Cut-off-Parameter zu verwenden. Das Signal-to-Noise Ratio (= Verhältnis aus Vordergrund- zu Hintergrundsignal) kann jedoch für die Genotypisierung nicht eingesetzt werden, da die Intensitäten von einigen MM-Sonden bei stringenten Bedingungen nicht vom Hintergrund zu unterscheiden sind. Dagegen könnte der Anteil an gesättigten Pixeln innerhalb eines Spots berücksichtigt werden. Vor allem bei der Genotypisierung, bei der alle Signale normiert werden, spielt dieser Aspekt eine wichtige Rolle.

Für die Berechnung der allelischen Diskriminierung wurde in dieser Arbeit auf das Verhältnis zwischen MM und PM (Grimm et al. 2004; Letowski et al. 2004) zurückgegriffen. Dabei liegen die RI_{MM} in allen Fällen zwischen Null und Eins. In dieser Arbeit wurde für alle Sonden ein $RI_{\text{MM}} < 70\%$, in den meisten Fällen sogar ein $RI_{\text{MM}} < 60\%$ berechnet. In einer anderen Studie wurde dagegen der Reziprokwert verwendet (Yu et al. 2004). Das Verhältnis von PM zu MM kann dabei zwischen 1 und ∞ liegen, was allerdings für die Darstellung der Diskriminierungsverteilungen ungünstig ist. Ein anderer Ansatz ist der Diskriminierungswert DS (Shapero et al. 2004), der als das Verhältnis der Differenz zwischen PM und MM zu der Summe beider Parameter definiert ist. Für relativ niedrige MM-Werte werden DS-Werte nahe Eins gemessen, und für relativ hohe MM-Werte werden DS-Werte in der Nähe von Null berechnet. Je höher die Diskriminierung des SONDENSATZES ist, desto größer ist auch der DS-Wert. In der erwähnten Studie wurde dabei ein Cut-off-Wert von $DS = 8\%$ vorgeschlagen. In Abbildung 4-7 sind beispielhaft die DS-Werte einer

Hybridisierung mit der *fimH*-Variante des Referenzstammes MG1655 (vgl. 3.1.3) abgebildet. Diese Darstellung hat den Vorteil, dass Sonden, die sich durch eine hohe Diskriminierung auszeichnen, hohe Werte erhalten. Für dieses Experiment wurde für alle MM-Sonden ein DS > 8 % berechnet, der einem MM/PM-Verhältnis von 85,2 % entspricht. Umgekehrt stimmen die in dieser Arbeit erzielten RI-Werte von 60 % bzw. 70 % mit DS-Werten von 25 % bzw. 17,8 % überein.

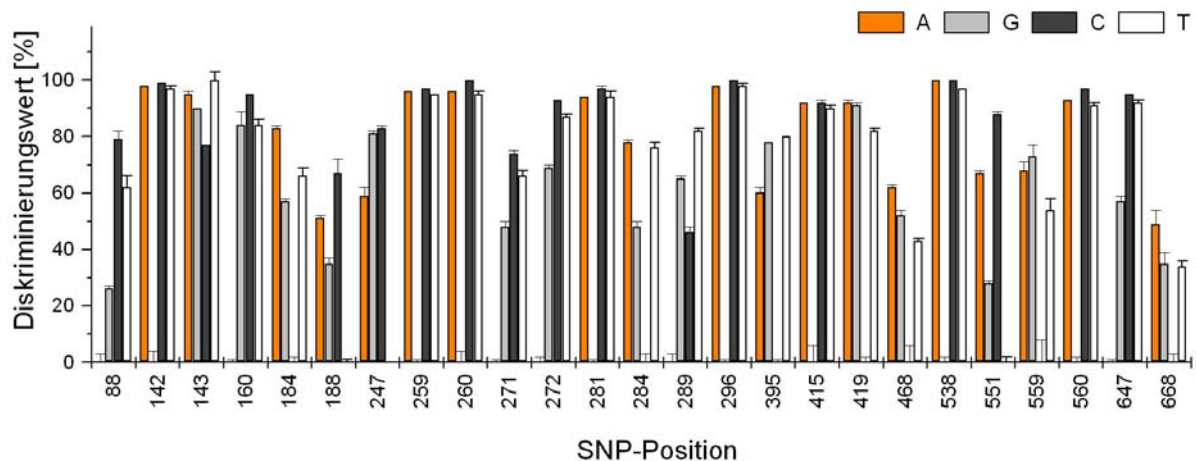


Abbildung 4-7: Diskriminierung zwischen PM- und MM-Sonden nach dem Diskriminierungswert DS (Shapero et al. 2004)

4.5. Verbesserte Genotypisierung durch den Einsatz einer Nuklease

In dieser Arbeit konnte erstmals die Aktivität der mismatchspezifischen Surveyor Nuclease auf einem Microarray nachgewiesen werden. Dieses Enzym gehört zu der Klasse der CEL I-Endonukleasen, die in unterschiedlichen Studien zum Nachweis spezifischer Mutationen verwendet wurden (Colbert et al. 2001; Perry et al. 2003; Sokurenko et al. 2001b; Till et al. 2004). Wie in 3.5.2 beschrieben wurde, konnte die Aktivität der Surveyor Nuclease auf einem Microarray für cytosinhaltige Fehlpaarungen nachgewiesen werden. Tatsächlich wurde gezeigt, dass sich dieses Enzym in Lösung durch eine Präferenz für cytosinhaltige Heteroduplexe (Oleykowski et al. 1998; Qiu et al. 2004) gegenüber anderen Fehlpaarungen auszeichnet (C-T, A-C und C-C > T-T > A-A und G-G > A-G und G-T).

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Aktivität gegenüber Deletionen/Insertionen von bis zu zwölf Nukleotiden innerhalb einer Sequenz doppelt so hoch ist wie die Aktivität gegenüber einzelnen Fehlpaarungen (Qiu et al. 2004). Diese Art der Einzelstrangaktivität könnte Erklärung dafür sein, dass in dieser Arbeit eine geringe, aber signifikante Aktivität des Enzyms gegenüber der fluoreszenzmarkierten Spottingkontrolle beobachtet werden konnte. Ebenfalls könnten Sonden, die um einen Spacer verlängert wurden, einen möglichen Angriffspunkt für die Nuklease darstellen, da sie nach der Hybridisierung mit der komplementären Ziel-DNA zumindest in dem Spacerbereich noch einzelsträngig vorliegen.

Ein weiterer kritischer Punkt des verwendeten Ansatzes ist die Pufferzusammensetzung des *Taq*-Puffers, der für dieses Enzym vom Hersteller

empfohlen wird. Dieser Puffer hat mit $I = 54,5 \text{ mM}$ nur eine unwesentlich höhere Ionenstärke als die stringente Waschlösung 3 mit $I = 48 \text{ mM}$. Das bedeutet, dass durch die zusätzliche Inkubation mit dem verwendeten Puffer das DNA-Hybrid deutlich länger stringenten Bedingungen ausgesetzt ist, die zu einer Reduktion des absoluten Signals führen können. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass auch in dem Kontrollversuch die Signalintensität der Homoduplexe (G-C-Paarung und PHK) stärker als die der Einzelstrang-DNA (SK) reduziert wurde. Die Einzelstrangaktivität des Enzyms kann also nicht alleine für diesen Signalverlust verantwortlich sein.

Trotz dieser beiden kritischen Gesichtspunkte konnte eine deutliche Verbesserung der allelischen Diskriminierung für die Genotypisierung anhand eines Komplexes aus immobilisierter Einzelstrang-DNA und fluoreszenzmarkierter Einzelstrang-Ziel-DNA erzielt werden. Dieses vielversprechende Ergebnis deutet das Potential für eine deutlich höhere Spezifität der Genotypisierung mit Hilfe der allelspezifischen Hybridisierung an. Die Frage, ob das in dieser Arbeit verwendete System auf die noch deutlich kompliziertere Konstruktion aus einem Komplex von doppelsträngiger Ziel-DNA und immobilisierter Einzelstrang-DNA übertragen werden kann, konnte in dieser Arbeit noch nicht untersucht werden. Tatsächlich sind in einem derartigen Komplex deutlich mehr unspezifische Angriffspunkte dieses Enzyms auf Homo- und Heteroduplexe denkbar, die in Abbildung 4-8 zusammengefasst sind. Darin soll verdeutlicht werden, dass neben der eigentlich erwünschten Mismatchaktivität eine ganze Reihe von möglichen Angriffspunkten der Nuklease möglich sind, die zu einer unspezifischen und unerwünschten Reduktion der Signale führen können.

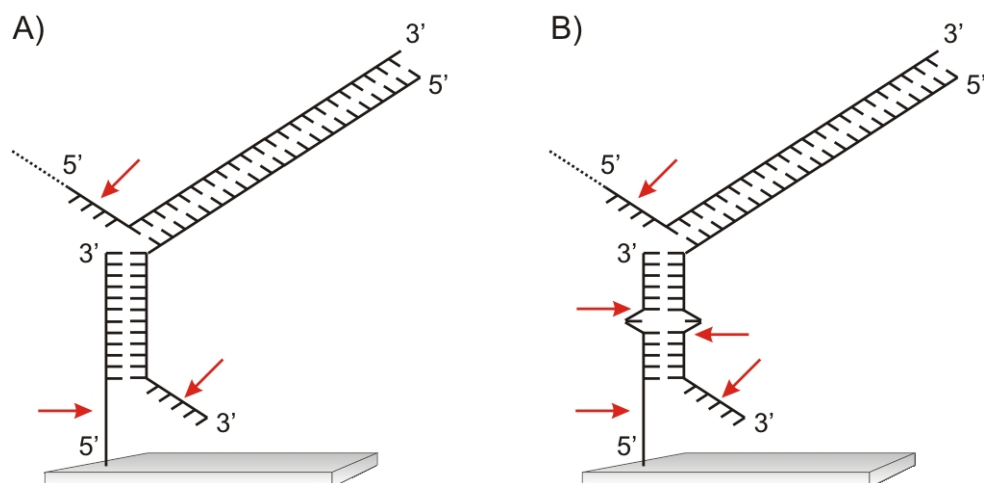


Abbildung 4-8: Mögliche Angriffspunkte der Surveyor Nuclease an einem Hybrid aus einzelsträngiger Sonde und doppelsträngiger Ziel-DNA. Für die komplementäre Ziel-DNA (A) können durch die Einzelstrangaktivität des Enzyms sowohl die Spacerregion der Sonde, als auch einzelsträngige Bereiche der Ziel-DNA verdaut werden. Zusätzlich werden in dem Heteroduplex (B) beide Stränge an der Mismatchposition jeweils am 3'-Ende geschnitten.

Zu den bisherigen Anwendungen der Surveyor Nuclease gehören unter anderem eine systematische Untersuchung von Punktmutationen in Resistenzgenen in *Mycobacterium tuberculosis* (Shi et al. 2006) und der Nachweis von Mutationen in der humanen mitochondrialen DNA (Bannwarth et al. 2006). Neben den CEL-Endonukleasen wurden auch andere Enzyme in unterschiedlichen Assays verwendet, mit deren Hilfe einzelne Mutationen spezifisch nachgewiesen werden

konnten und die damit eine Alternative zu dem hier untersuchten System darstellen. Dazu gehören die beiden Phagenresolvasen T4 Endonuklease VII und T7 Endonuklease I (Babon et al. 2000), die sich jedoch durch eine hohe Hintergrundaktivität gegenüber Homoduplexen auszeichnen (Gao et al. 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Spezifität einer durch gerichtete Evolution hergestellten Variante einer Endonuklease V von purin- zu cytosinhaltigen Fehlpaarungen verändert werden konnte (Gao et al. 2007). Weitere Beispiele sind die MutY DNA-Glykosylase und die Thymidin-DNA-Glykosylase (Zhang et al. 2002). Schließlich konnte auch für die beiden einzelstrangspezifischen S1- und Mungobohnen-Nuklease eine unspezifische Mismatchaktivität nachgewiesen werden (Till et al. 2004). Interessanterweise wurde diese Enzymklasse auch für eine Erhöhung der Spezifität von PNA-DNA-Duplexen verwendet (Gaylord et al. 2005; Komiyama et al. 2003).

Eine Alternative zu den enzymbasierten Methoden zur erhöhten Spezifität der Genotypisierung ist der Einsatz bestimmter Chemikalien, die nachweislich Fehlpaarungen schneiden können. So wurde der Abbau von cytosin- und thymidinhaltigen Heteroduplexen durch Osmiumtetroxid oder Hydroxylamin beschrieben (Cotton et al. 1988); beide Chemikalien sind jedoch als gesundheits- bzw. umweltschädigend eingestuft. Alternativ dazu wurde auch Kaliumpermanganat eingesetzt (Roberts et al. 1997), welches neben den Fehlpaarungen zusätzlich kurze Insertionseinheiten schneiden kann.

4.6. Ausblick

Der zentrale Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung eines Microarrays zur Untersuchung der genomischen DNA von *Escherichia coli* auf spezifische Mutationen, die zum einen Rückschlüsse auf die Pathogenität (*fimH*) und zum anderen den Nachweis auf eine mögliche Antibiotikaresistenz (*gyrA*) erlauben. Beide Aspekte nehmen eine zentrale Rolle in der Erregerdiagnostik ein und versprechen eine prospektive und adäquate Therapie. Vor allem die Untersuchung der Pathogenitätseigenschaften bietet ein vielversprechendes Potential für eine Erweiterung des vorgestellten Assays. Zum einen könnte die Integration von Sonden für den Nachweis spezifischer Virulenzfaktoren neue Aufschlüsse über Infektionsprozesse geben; zum anderen würde die Integration eines Systems zur Klassifizierung der ECOR-Gruppen („Phylotyping-Microarray“) nach der Methode von Hommais und Mitarbeitern (Hommais et al. 2005) neue interessante Informationen über die relevanten Erreger liefern. Neben der Erregerseite spielen allerdings auch genetische Prädispositionen beim Wirt eine wichtige Rolle im Verlauf einer Infektion. So konnte beispielsweise eine genetisch bedingte verminderte Expression des humanen IL-8-Rezeptors mit einer erhöhten Anfälligkeit des Wirtes für eine Pyeloniphritis in Verbindung gebracht werden (Lundstedt et al. 2007). Die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen dem Wirt und dem pathogenen Erreger - und damit der Nachweis bestimmter genetischer Prädispositionen sowohl beim Wirt als auch bei dem Bakterium - wird in der Zukunft eine zunehmend wichtigere Rolle in der Infektionsdiagnostik einnehmen.

Der Einsatz der mismatchspezifischen Endonuklease ist ein vielversprechender Ansatz, um die Spezifität der Genotypisierung signifikant zu erhöhen und folglich auch gemischte Populationen besser auflösen zu können. Offene Punkte, die sich bezüglich 4.5 ergeben und Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben, sind die Sonden- und Spacerlänge, die Position der Fehlpaarung in einem DNA-Duplex und die Präferenz von bestimmten Mismatch-Konstellationen. Schließlich muss solch ein System auch mit einer Realprobe validiert werden. Außerdem ist mit diesem Ansatz ein Assay aus markierter Sonde und unmarkierter Ziel-DNA denkbar (Abbildung 4-9), der den kostenintensiven Schritt der Fluoreszenzmarkierung der Ziel-DNA umgeht. Dieser Schritt hat zusätzlich den Vorteil, dass die quantitative Verzerrung der Ziel-DNA, die aus der Amplifizierung mit Hilfe der PCR resultiert, vermieden werden kann.

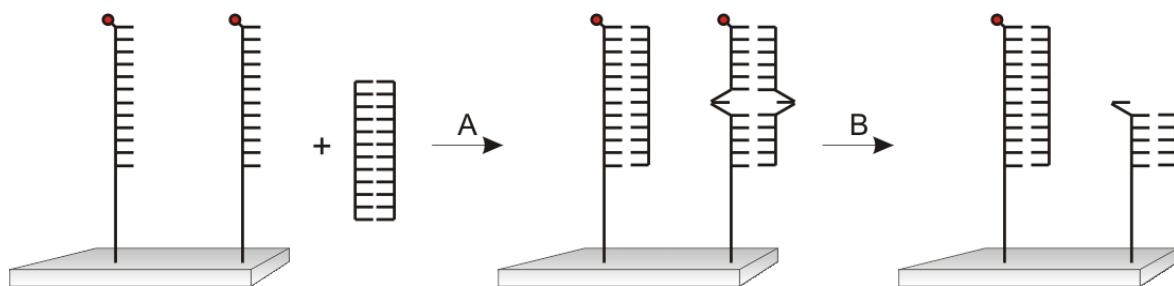


Abbildung 4-9: Möglicher Assay zur Detektion unmarkierter DNA durch den Einsatz der mismatchspezifischen Nuklease. Nach der Hybridisierung (A) der fluoreszenzmarkierten Sonde mit der Ziel-DNA (bspw. PCR-Produkt oder fragmentierte genomische DNA) werden Heteroduplexe durch die Nukleaseaktivität (B) verdaut, so dass die Fluoreszenzmarkierung an der Sonde entfernt wird.

5. Anhang

5.1. Literaturverzeichnis

1. Acar, J.F., Goldstein, F.W., 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 24 Suppl 1, S67-S73.
2. Babon, J.J., McKenzie, M., Cotton, R.G., 2000. The use of resolvases T4 endonuclease VII and T7 endonuclease I in mutation detection. *Methods Mol. Biol.* 152, 187-199.
3. Bagel, S., Hullen, V., Wiedemann, B., Heisig, P., 1999. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 868-875.
4. Ballmer, K., Korczak, B.M., Kuhnert, P., Slickers, P., Ehricht, R., Hachler, H., 2007. Fast DNA Serotyping of *Escherichia coli* by Use of an Oligonucleotide Microarray. *J. Clin. Microbiol.* 45, 370-379.
5. Baner, J., Isaksson, A., Waldenstrom, E., Jarvius, J., Landegren, U., Nilsson, M., 2003. Parallel gene analysis with allele-specific padlock probes and tag microarrays. *Nucleic Acids Res* 31, e103.
6. Bannwarth, S., Procaccio, V., Paquis-Flucklinger, V., 2006. Rapid identification of unknown heteroplasmic mutations across the entire human mitochondrial genome with mismatch-specific Surveyor Nuclease. *Nat. Protoc.* 1, 2037-2047.
7. Baorto, D.M., Gao, Z., Malaviya, R., Dustin, M.L., van der, M.A., Lublin, D.M., Abraham, S.N., 1997. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* 389, 636-639.
8. Bar-Shavit, Z., Goldman, R., Ofek, I., Sharon, N., Mirelman, D., 1980. Mannose-binding activity of *Escherichia coli*: a determinant of attachment and ingestion of the bacteria by macrophages. *Infect. Immun.* 29, 417-424.
9. Behrens, H.A., Pignot, M., Windhab, N., Kappel, A., 2002. Rapid parallel mutation scanning of gene fragments using a microelectronic protein-DNA chip format. *Nucleic Acids Res.* 30, e64.
10. Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J., Harel, J., 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2113-2125.
11. Bingen, E., Bonacorsi, S., Brahimi, N., Denamur, E., Elion, J., 1997. Virulence patterns of *Escherichia coli* K1 strains associated with neonatal meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2981-2982.
12. Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., ColladoVides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462.

13. Blomfield,I.C., McClain,M.S., Princ,J.A., Calie,P.J., Eisenstein,B.I., 1991. Type 1 fimbriation and fimE mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 173, 5298-5307.
14. Boon,E.M., Ceres,D.M., Drummond,T.G., Hill,M.G., Barton,J.K., 2000. Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes. *Nat. Biotechnol.* 18, 1096-1100.
15. Booth,S.A., Drobot,M.A., Martin,I.E., Ng,L.K., 2003. 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.
16. Boucher,J.C., Yu,H., Mudd,M.H., Deretic,V., 1997. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect. Immun.* 65, 3838-3846.
17. Boudeau,J., Barnich,N., Darfeuille-Michaud,A., 2001. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells. *Molecular Microbiology* 39, 1272-1284.
18. Boyd,E.F., Hartl,D.L., 1997. Nonrandom location of IS1 elements in the genomes of natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 14, 725-732.
19. Bruant,G., Maynard,C., Bekal,S., Gaucher,I., Masson,L., Brousseau,R., Harel,J., 2006. Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3780-3784.
20. Bryan,A., Roesch,P., Davis,L., Moritz,R., Pellett,S., Welch,R.A., 2006. Regulation of type 1 fimbriae by unlinked FimB- and FimE-like recombinases in uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073. *Infect. Immun.* 74, 1072-1083.
21. Buck,A.H., Campbell,C.J., Dickinson,P., Mountford,C.P., Stoquert,H.C., Terry,J.G., Evans,S.A., Keane,L.M., Su,T.J., Mount,A.R., Walton,A.J., Beattie,J.S., Crain,J., Ghazal,P., 2007. DNA nanoswitch as a biosensor. *Anal. Chem.* 79, 4724-4728.
22. Casalino,M., Latella,M.C., Prosseda,G., Colonna,B., 2003. CadC is the preferential target of a convergent evolution driving enteroinvasive *Escherichia coli* toward a lysine decarboxylase-defective phenotype. *Infect. Immun.* 71, 5472-5479.
23. Chen,F.J., Lo,H.J., 2003. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36, 1-9.
24. Chen,S., Zhao,S.H., McDermott,P.F., Schroeder,C.M., White,D.G., Meng,J.H., 2005. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Probes* 19, 195-201.

25. Chen,S.L., Hung,C.S., Xu,J., Reigstad,C.S., Magrini,V., Sabo,A., Blasiar,D., Bieri,T., Meyer,R.R., Ozersky,P., Armstrong,J.R., Fulton,R.S., Latreille,J.P., Spieth,J., Hooton,T.M., Mardis,E.R., Hultgren,S.J., Gordon,J.I., 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 5977-5982.
26. Chizhikov,V., Rasooly,A., Chumakov,K., Levy,D.D., 2001. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl. Environ Microbiol.* 67, 3258-3263.
27. Choudhury,D., Thompson,A., Stojanoff,V., Langermann,S., Pinkner,J., Hultgren,S.J., Knight,S.D., 1999. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 285, 1061-1066.
28. Clermont,O., Bonacorsi,S., Bingen,E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555-4558.
29. Clermont,O., Cordevant,C., Bonacorsi,S., Marecat,A., Lange,M., Bingen,E., 2001. Automated ribotyping provides rapid phylogenetic subgroup affiliation of clinical extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4549-4553.
30. Cleven,B.E., Palka-Santini,M., Gielen,J., Meembor,S., Kronke,M., Krut,O., 2006. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2389-2397.
31. Coimbra,R.S., Grimont,F., Lenormand,P., Burguiere,P., Beutin,L., Grimont,P.A., 2000. Identification of *Escherichia coli* O-serogroups by restriction of the amplified O-antigen gene cluster (rfb-RFLP). *Res. Microbiol.* 151, 639-654.
32. Colbert,T., Till,B.J., Tompa,R., Reynolds,S., Steine,M.N., Yeung,A.T., McCallum,C.M., Comai,L., Henikoff,S., 2001. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol* 126, 480-484.
33. Connell,H., Agace,W., Klemm,P., Schembri,M., Marild,S., Svanborg,C., 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9827-9832.
34. Conrad,S., Oethinger,M., Kaifel,K., Klotz,G., Marre,R., Kern,W.V., 1996. *gyrA* mutations in high-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 38, 443-455.
35. Costabile,M., Quach,A., Ferrante,A., 2006. Molecular approaches in the diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Hum. Mutat.* 27, 1163-1173.
36. Cotton,R.G., Rodrigues,N.R., Campbell,R.D., 1988. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 4397-4401.
37. Day,W.A., Jr., Fernandez,R.E., Maurelli,A.T., 2001. Pathoadaptive mutations that enhance virulence: genetic organization of the *cadA* regions of *Shigella* spp. *Infect. Immun.* 69, 7471-7480.

38. Dell'Atti,D., Tombelli,S., Minunni,M., Mascini,M., 2006. Detection of clinically relevant point mutations by a novel piezoelectric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 21, 1876-1879.
39. Dobrindt,U., Agerer,F., Michaelis,K., Janka,A., Buchrieser,C., Samuelson,M., Svanborg,C., Gottschalk,G., Karch,H., Hacker,J., 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J. Bacteriol.* 185, 1831-1840.
40. Dobrindt,U., Blum-Oehler,G., Nagy,G., Schneider,G., Johann,A., Gottschalk,G., Hacker,J., 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I-536 to PAI IV536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity* 70, 6365-6372.
41. Drummond,T.G., Hill,M.G., Barton,J.K., 2003. Electrochemical DNA sensors. *Nat. Biotechnol.* 21, 1192-1199.
42. Fisher,J.F., Meroueh,S.O., Mobashery,S., 2005. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* 105, 395-424.
43. Fluit,A.C., Visser,M.R., Schmitz,F.J., 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 836-71, table.
44. Friedman,S.M., Lu,T., Drlica,K., 2001. Mutation in the DNA gyrase A Gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2378-2380.
45. Gao,H., Huang,J., Barany,F., Cao,W., 2007. Switching base preferences of mismatch cleavage in endonuclease V: an improved method for scanning point mutations. *Nucleic Acids Res.* 35, e2.
46. Gaylord,B.S., Massie,M.R., Feinstein,S.C., Bazan,G.C., 2005. SNP detection using peptide nucleic acid probes and conjugated polymers: Applications in neurodegenerative disease identification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 34-39.
47. Gerry,N.P., Witowski,N.E., Day,J., Hammer,R.P., Barany,G., Barany,F., 1999. Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J. Mol. Biol.* 292, 251-262.
48. Grimm,V., Ezaki,S., Susa,M., Knabbe,C., Schmid,R.D., Bachmann,T.T., 2004. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3766-3774.
49. Gunther,N.W., Lockett,V., Johnson,D.E., Mobley,H.L.T., 2001. In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. *Infection and Immunity* 69, 2838-2846.
50. Guo,Z., Guilfoyle,R.A., Thiel,A.J., Wang,R., Smith,L.M., 1994. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res.* 22, 5456-5465.
51. Hacker,J., Hentschel,U., Dobrindt,U., 2003. Prokaryotic chromosomes and disease. *Science* 301, 790-793.

52. Hacker, J., Kaper, J.B., 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 641-679.
53. Hamelin, K., Bruant, G., El Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.A., Bekal, S., Fairbrother, J.M., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., Brousseau, R., 2006. A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from Great Lakes recreational waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4200-4206.
54. Hamelin, K., Bruant, G., El Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T.A., Fairbrother, J., Harel, J., Maynard, C., Masson, L., Brousseau, R., 2007. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 477-484.
55. Harris, S.L., Spears, P.A., Havell, E.A., Hamrick, T.S., Horton, J.R., Orndorff, P.E., 2001. Characterization of *Escherichia coli* type 1 pilus mutants with altered binding specificities. *Journal of Bacteriology* 183, 4099-4102.
56. Hata, M., Suzuki, M., Matsumoto, M., Takahashi, M., Sato, K., Ibe, S., Sakae, K., 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 801-803.
57. Hau, T., 1990. Bacteria, toxins, and the peritoneum. *World J. Surg.* 14, 167-175.
58. Hedenmalm, K., Spigset, O., 1996. Peripheral sensory disturbances related to treatment with fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 37, 831-837.
59. Heisig, P., 1996. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 879-885.
60. Heisig, P., Schedletzky, H., Falkenstein-Paul, H., 1993. Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 696-701.
61. Herzer, P.J., Inouye, S., Inouye, M., Whittam, T.S., 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 6175-6181.
62. Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Carniel, E., Hacker, J., 2006. Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol. Microbiol.* 61, 584-595.
63. Hommais, F., Gouriou, S., Amarin, C., Bui, H., Rahimy, M.C., Picard, B., Denamur, E., 2003. The FimH A27V mutation is pathoadaptive for urovirulence in *Escherichia coli* B2 phylogenetic group isolates. *Infect. Immun.* 71, 3619-3622.
64. Hommais, F., Pereira, S., Acquaviva, C., Escobar-Paramo, P., Denamur, E., 2005. Single-nucleotide polymorphism phylotyping of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4784-4792.

65. Hooton, T.M., Scholes, D., Hughes, J.P., Winter, C., Roberts, P.L., Stapleton, A.E., Stergachis, A., Stamm, W.E., 1996. A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *N. Engl. J. Med.* 335, 468-474.
66. Hopkins, K.L., Arnold, C., Threlfall, E.J., 2007. Rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing technology. *J. Microbiol. Methods* 68, 163-171.
67. Hull, R.A., Donovan, W.H., Del Terzo, M., Stewart, C., Rogers, M., Darouiche, R.O., 2002. Role of type 1 fimbria- and P fimbria-specific adherence in colonization of the neurogenic human bladder by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 70, 6481-6484.
68. Hung, C.S., Bouckaert, J., Hung, D., Pinkner, J., Widberg, C., DeFusco, A., Auguste, C.G., Strouse, R., Langermann, S., Waksman, G., Hultgren, S.J., 2002. Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Molecular Microbiology* 44, 903-915.
69. Inouye, M., Ikeda, R., Takase, M., Tsurii, T., Chiba, J., 2005. Single-nucleotide polymorphism detection with "wire-like" DNA probes that display quasi "on-off" digital action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 11606-11610.
70. Ito, T., Hosokawa, K., Maeda, M., 2007. Detection of single-base mismatch at distal end of DNA duplex by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1816-1819.
71. Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A., Hooper, D.C., 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1178-1182.
72. Jenkins, C., van Ijperen, C., Dudley, E.G., Chart, H., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Smith, H.R., Nataro, J.P., 2005. Use of a microarray to assess the distribution of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 119-124.
73. Johnson, J.R., 1991. Virulence Factors in *Escherichia-Coli* Urinary-Tract Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 80-128.
74. Johnson, J.R., Russo, T.A., 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 383-404.
75. Johnson, J.R., Stell, A.L., 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* 181, 261-272.
76. Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamale, P., Johnson, S.J., Doetkott, C., Skyberg, J.A., Lynne, A.M., Johnson, J.R., Nolan, L.K., 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J. Bacteriol.* 189, 3228-3236.
77. Jones, C.H., Pinkner, J.S., Nicholes, A.V., Slonim, L.N., Abraham, S.N., Hultgren, S.J., 1993. *FimC* Is A Periplasmic Papd-Like Chaperone That Directs Assembly of Type-1 Pili in Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8397-8401.

78. Jones,C.H., Pinkner,J.S., Roth,R., Heuser,J., Nicholes,A.V., Abraham,S.N., Hultgren,S.J., 1995. Fimh Adhesin of Type-1 Pili Is Assembled Into A Fibrillar Tip Structure in the Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2081-2085.
79. Justice,S.S., Hung,C., Theriot,J.A., Fletcher,D.A., Anderson,G.G., Footer,M.J., Hultgren,S.J., 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1333-1338.
80. Kahlmeter,G., 2000. The ECO*SENS Project: a prospective, multinational, multicentre epidemiological survey of the prevalence and antimicrobial susceptibility of urinary tract pathogens-interim report. *J. Antimicrob. Chemother.* 46 Suppl A, 15-22.
81. Kahlmeter,G., 2003. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 69-76.
82. Kallen,A.J., Welch,H.G., Sirovich,B.E., 2006. Current antibiotic therapy for isolated urinary tract infections in women. *Arch. Intern. Med.* 166, 635-639.
83. Kaper,J.B., 2005. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 355-356.
84. Kaper,J.B., Nataro,J.P., Mobley,H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123-140.
85. Katouli,M., Brauner,A., Haghighi,L.K., Kaijser,B., Muratov,V., Mollby,R., 2005. Virulence characteristics of *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in young adults in Iran. *J. Infect.* 50, 312-321.
86. Katz,L., Ashley,G.W., 2005. Translation and protein synthesis: macrolides. *Chem. Rev.* 105, 499-528.
87. Kim,K.S., Itabashi,H., Gemski,P., Sadoff,J., Warren,R.L., Cross,A.S., 1992. The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *J. Clin. Invest* 90, 897-905.
88. Klumpp,D.J., Weiser,A.C., Sengupta,S., Forrestal,S.G., Batler,R.A., Schaeffer,A.J., 2001. Uropathogenic *Escherichia coli* potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF-kappa B. *Infection and Immunity* 69, 6689-6695.
89. Komiyama,M., Ye,S., Liang,X.G., Yamamoto,Y., Tomita,T., Zhou,J.M., Aburatani,H., 2003. PNA for one-base differentiating protection of DNA from nuclease and its use for SNPs detection. *Journal of the American Chemical Society* 125, 3758-3762.
90. Kompis,I.M., Islam,K., Then,R.L., 2005. DNA and RNA synthesis: antifolates. *Chem. Rev.* 105, 593-620.
91. Korczak,B., Frey,J., Schrenzel,J., Pluschke,G., Pfister,R., Ehricht,R., Kuhnert,P., 2005. Use of diagnostic microarrays for determination of virulence gene patterns of *Escherichia coli* K1, a major cause of neonatal meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1024-1031.

92. Kostic,T., Weilharter,A., Rubino,S., Delogu,G., Uzzau,S., Rudi,K., Sessitsch,A., Bodrossy,L., 2007. A microbial diagnostic microarray technique for the sensitive detection and identification of pathogenic bacteria in a background of nonpathogens. *Anal. Biochem.* 360, 244-254.
93. Krogfelt,K.A., Bergmans,H., Klemm,P., 1990. Direct Evidence That the FimH Protein Is the Mannose-Specific Adhesin of Escherichia-Coli Type-1 Fimbriae. *Infection and Immunity* 58, 1995-1998.
94. Kukkonen,M., Raunio,T., Virkola,R., Lahteenmaki,K., Makela,P.H., Klemm,P., Clegg,S., Korhonen,T.K., 1993. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of Salmonella enterica and Escherichia coli to laminin. *Mol. Microbiol.* 7, 229-237.
95. Langermann,S., Palaszynski,S., Barnhart,M., Auguste,G., Pinkner,J.S., Burlein,J., Barren,P., Koenig,S., Leath,S., Jones,C.H., Hultgren,S.J., 1997. Prevention of mucosal Escherichia coli infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 276, 607-611.
96. Lapierre,P., Huletsky,A., Fortin,V., Picard,F.J., Roy,P.H., Ouellette,M., Bergeron,M.G., 2003. Real-time PCR assay for detection of fluoroquinolone resistance associated with grlA mutations in Staphylococcus aureus. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3246-3251.
97. Latif,S., Bauer-Sardina,I., Ranade,K., Livak,K.J., Kwok,P.Y., 2001. Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis II: 5'-nuclease assay. *Genome Res.* 11, 436-440.
98. Lawrence,J.G., Roth,J.R., 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* 143, 1843-1860.
99. Lee,I., Dombkowski,A.A., Athey,B.D., 2004. Guidelines for incorporating non-perfectly matched oligonucleotides into target-specific hybridization probes for a DNA microarray. *Nucleic Acids Res.* 32, 681-690.
100. Lehn,N., Stower-Hoffmann,J., Kott,T., Strassner,C., Wagner,H., Kronke,M., Schneider-Brachert,W., 1996. Characterization of clinical isolates of Escherichia coli showing high levels of fluoroquinolone resistance. *J. Clin. Microbiol.* 34, 597-602.
101. Leinberger,D.M., Schumacher,U., Autenrieth,I.B., Bachmann,T.T., 2005. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4943-4953.
102. Lengeler,J.W., Drews,G., Schlegel,H.G., 1999. *Biology of the Prokaryotes*. Georg Thieme Verlag.
103. Letowski,J., Brousseau,R., Masson,L., 2004. Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. *J. Microbiol. Methods* 57, 269-278.
104. Li,Y., Liu,D., Cao,B., Han,W., Liu,Y., Liu,F., Guo,X., Bastin,D.A., Feng,L., Wang,L., 2006. Development of a serotype-specific DNA microarray for identification of some Shigella and pathogenic Escherichia coli strains. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4376-4383.

105. Lim,J.K., Gunther,N.W., Zhao,H., Johnson,D.E., Keay,S.K., Mobley,H.L.T., 1998. In vivo phase variation of *Escherichia coli* type 1 fimbrial genes in women with urinary tract infection. *Infection and Immunity* 66, 3303-3310.
106. Lindroos,K., Sigurdsson,S., Johansson,K., Ronnblom,L., Syvanen,A.C., 2002. Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucleic Acids Res.* 30, e70.
107. Liu,R.H., Yang,J., Lenigk,R., Bonanno,J., Grodzinski,P., 2004. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Anal. Chem.* 76, 1824-1831.
108. Long,Y.T., Li,C.Z., Sutherland,T.C., Kraatz,H.B., Lee,J.S., 2004. Electrochemical detection of single-nucleotide mismatches: application of M-DNA. *Anal. Chem.* 76, 4059-4065.
109. Lundstedt,A.C., Leijonhufvud,I., Ragnarsdottir,B., Karpman,D., Andersson,B., Svanborg,C., 2007. Inherited susceptibility to acute pyelonephritis: a family study of urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* 195, 1227-1234.
110. Magnet,S., Blanchard,J.S., 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.* 105, 477-498.
111. Mahillon,J., Chandler,M., 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 725-774.
112. Makino,K., Yokoyama,K., Kubota,Y., Yutsudo,C.H., Kimura,S., Kurokawa,K., Ishii,K., Hattori,M., Tatsuno,I., Abe,H., Iida,T., Yamamoto,K., Onishi,M., Hayashi,T., Yasunaga,T., Honda,T., Sasakawa,C., Shinagawa,H., 1999. Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes Genet. Syst.* 74, 227-239.
113. Malaviya,R., Ross,E., Jakschik,B.A., Abraham,S.N., 1994. Mast-Cell Degranulation Induced by Type-1 Fimbriated *Escherichia-Coli* in Mice. *Journal of Clinical Investigation* 93, 1645-1653.
114. Mammeri,H., Poirel,L., Nordmann,P., 2005. Bactericidal activity of fluoroquinolones against plasmid-mediated QnrA-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 1048-1049.
115. Martinez,J.J., Mulvey,M.A., Schilling,J.D., Pinkner,J.S., Hultgren,S.J., 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo Journal* 19, 2803-2812.
116. Martinez-Martinez,L., Fernandez,F., Perea,E.J., 1999. Relationship between haemolysis production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 277-279.
117. Martinez-Martinez,L., Pascual,A., Jacoby,G.A., 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351, 797-799.
118. Maurelli,A.T., Fernandez,R.E., Bloch,C.A., Rode,C.K., Fasano,A., 1998. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3943-3948.

119. McCormick,B.A., Franklin,D.P., Laux,D.C., Cohen,P.S., 1989. Type-1 Pili Are Not Necessary for Colonization of the Streptomycin-Treated Mouse Large-Intestine by Type-1-Piliated Escherichia-Coli F-18 and Escherichia-Coli K-12. *Infection and Immunity* 57, 3022-3029.
120. Mein,C.A., Barratt,B.J., Dunn,M.G., Siegmund,T., Smith,A.N., Esposito,L., Nutland,S., Stevens,H.E., Wilson,A.J., Phillips,M.S., Jarvis,N., Law,S., de Arruda,M., Todd,J.A., 2000. Evaluation of single nucleotide polymorphism typing with invader on PCR amplicons and its automation. *Genome Res.* 10, 330-343.
121. Mitscher,L.A., 2005. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chem. Rev.* 105, 559-592.
122. Mobley,H.L.T., Chippendale,G.R., Tenney,J.H., Hull,R.A., Warren,J.W., 1987. Expression of Type-1 Fimbriae May be Required for Persistence of Escherichia-Coli in the Catheterized Urinary-Tract. *Journal of Clinical Microbiology* 25, 2253-2257.
123. Mouritzen,P., Nielsen,A.T., Pfundheller,H.M., Choleva,Y., Kongsbak,L., Moller,S., 2003. Single nucleotide polymorphism genotyping using locked nucleic acid (LNA). *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 3, 27-38.
124. Mühldorfer,I., Ziebuhr,W., Hacker,J., 2001. Escherichia coli in Urinary Tract Infections. In: Sussman,M. (Ed.), *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 1515-1540.
125. Mulvey,M.A., 2002. Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli. *Cell Microbiol.* 4, 257-271.
126. Mulvey,M.A., Lopez-Boado,Y.S., Wilson,C.L., Roth,R., Parks,W.C., Heuser,J., Hultgren,S.J., 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli. *Science* 282, 1494-1497.
127. Mulvey,M.A., Schilling,J.D., Martinez,J.J., Hultgren,S.J., 2000. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic Escherichia coli and innate host defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8829-8835.
128. Mysorekar,I.U., Mulvey,M.A., Hultgren,S.J., Gordon,J.I., 2002. Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry* 277, 7412-7419.
129. Niederman,M.S., 2001. Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care. *Crit Care Med.* 29, N114-N120.
130. O'Meara,D., Ahmadian,A., Odeberg,J., Lundeberg,J., 2002. SNP typing by apyrase-mediated allele-specific primer extension on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 30, e75.
131. Obata-Yasuoka,M., Ba-Thein,W., Tsukamoto,T., Yoshikawa,H., Hayashi,H., 2002. Vaginal Escherichia coli share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal E. coli. *Microbiology* 148, 2745-2752.
132. Ochman,H., Selander,R.K., 1984. Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. *J. Bacteriol.* 157, 690-693.

133. Oleykowski,C.A., Mullins,C.R.B., Godwin,A.K., Yeung,A.T., 1998. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Research* 26, 4597-4602.
134. Oliphant,C.M., Green,G.M., 2002. Quinolones: a comprehensive review. *Am. Fam. Physician* 65, 455-464.
135. Orndorff,P.E., Devapali,A., Palestrant,S., Wyse,A., Everett,M.L., Bollinger,R.R., Parker,W., 2004. Immunoglobulin-mediated agglutination of and biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 require the type 1 pilus fiber. *Infect. Immun.* 72, 1929-1938.
136. Ott,M., Bender,L., Blum,G., Schmittroth,M., Achtman,M., Tschape,H., Hacker,J., 1991. Virulence patterns and long-range genetic mapping of extraintestinal *Escherichia coli* K1, K5, and K100 isolates: use of pulsed-field gel electrophoresis. *Infect. Immun.* 59, 2664-2672.
137. Ozeki,S., Deguchi,T., Yasuda,M., Nakano,M., Kawamura,T., Nishino,Y., Kawada,Y., 1997. Development of a rapid assay for detecting *gyrA* mutations in *Escherichia coli* and determination of incidence of *gyrA* mutations in clinical strains isolated from patients with complicated urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2315-2319.
138. Pak,J., Pu,Y., Zhang,Z.T., Hasty,D.L., Wu,X.R., 2001. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J. Biol. Chem* 276, 9924-9930.
139. Pastinen,T., Kurg,A., Metspalu,A., Peltonen,L., Syvanen,A.C., 1997. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res.* 7, 606-614.
140. Patolsky,F., Lichtenstein,A., Willner,I., 2001. Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction. *Nat. Biotechnol.* 19, 253-257.
141. Perna,N.T., Plunkett,G., Burland,V., Mau,B., Glasner,J.D., Rose,D.J., Mayhew,G.F., Evans,P.S., Gregor,J., Kirkpatrick,H.A., Posfai,G., Hackett,J., Klink,S., Boutin,A., Shao,Y., Miller,L., Grotbeck,E.J., Davis,N.W., Limk,A., Dimalanta,E.T., Potamosis,K.D., Apodaca,J., Anantharaman,T.S., Lin,J.Y., Yen,G., Schwartz,D.C., Welch,R.A., Blattner,F.R., 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Nature* 409, 529-533.
142. Perry,J.A., Wang,T.L., Welham,T.J., Gardner,S., Pike,J.M., Yoshida,S., Parniske,M., 2003. A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 131, 866-871.
143. Peytavi,R., Liu-Ying,T., Raymond,F.R., Boissinot,K., Bissonnette,L., Boissinot,M., Picard,F.J., Huletsky,A., Ouellette,M., Bergeron,M.G., 2005. Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid. *Biotechniques* 39, 89-96.
144. Picard,B., Garcia,J.S., Gouriou,S., Duriez,P., Brahim,N., Bingen,E., Elion,J., Denamur,E., 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* 67, 546-553.

145. Posfai,G., Plunkett,G., III, Feher,T., Frisch,D., Keil,G.M., Umenhoffer,K., Kolisnychenko,V., Stahl,B., Sharma,S.S., de Arruda,M., Burland,V., Harcum,S.W., Blattner,F.R., 2006. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science* 312, 1044-1046.
146. Pouttu,R., Puustinen,T., Virkola,R., Hacker,J., Klemm,P., Korhonen,T.K., 1999. Amino acid residue Ala-62 in the FimH fimbrial adhesin is critical for the adhesiveness of meningitis-associated *Escherichia coli* to collagens. *Molecular Microbiology* 31, 1747-1757.
147. Prager,R., Strutz,U., Fruth,A., Tschape,H., 2003. Subtyping of pathogenic *Escherichia coli* strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus *fliC* polymorphisms. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 477-486.
148. Pratt,L.A., Kolter,R., 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 598-603.
149. Qiu,P., Shandilya,H., D'Alessio,J.M., O'Connor,K., Durocher,J., Gerard,G.F., 2004. Mutation detection using Surveyor (TM) nuclease. *Biotechniques* 36, 702-+.
150. Ramphal,R., 2005. Importance of adequate initial antimicrobial therapy. *Chemotherapy* 51, 171-176.
151. Randall,L.P., Coldham,N.G., Woodward,M.J., 2005. Detection of mutations in *Salmonella enterica* *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) using standard HPLC instrumentation. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 619-623.
152. Riley,M., Abe,T., Arnaud,M.B., Berlyn,M.K., Blattner,F.R., Chaudhuri,R.R., Glasner,J.D., Horiuchi,T., Keseler,I.M., Kosuge,T., Mori,H., Perna,N.T., Plunkett,G., III, Rudd,K.E., Serres,M.H., Thomas,G.H., Thomson,N.R., Wishart,D., Wanner,B.L., 2006. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005. *Nucleic Acids Res.* 34, 1-9.
153. Roberts,E., Deeble,V.J., Woods,C.G., Taylor,G.R., 1997. Potassium permanganate and tetraethylammonium chloride are a safe and effective substitute for osmium tetroxide in solid-phase fluorescent chemical cleavage of mismatch. *Nucleic Acids Res.* 25, 3377-3378.
154. Robicsek,A., Strahilevitz,J., Jacoby,G.A., Macielag,M., Abbanat,D., Park,C.H., Bush,K., Hooper,D.C., 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 12, 83-88.
155. Ronaghi,M., 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 11, 3-11.
156. Ruiz,J., 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1109-1117.
157. Ruiz,J., Simon,K., Horcajada,J.P., Velasco,M., Barranco,M., Roig,G., Moreno-Martinez,A., Martinez,J.A., Jimenez,d.A., Mensa,J., Vila,J., 2002. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4445-4449.

158. Russo,T.A., Johnson,J.R., 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181, 1753-1754.
159. Sanger,F., Nicklen,S., Coulson,A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
160. Sato,K., Hosokawa,K., Maeda,M., 2003. Rapid aggregation of gold nanoparticles induced by non-cross-linking DNA hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8102-8103.
161. Sauer,F.G., Futterer,K., Pinkner,J.S., Dodson,K.W., Hultgren,S.J., Waksman,G., 1999. Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science* 285, 1058-1061.
162. Sauer,U., Preininger,C., Hany-Schmatzberger,R., 2005. Quick and simple: quality control of microarray data. *Bioinformatics* 21, 1572-1578.
163. Sawyer,S.A., Dykhuizen,D.E., DuBose,R.F., Green,L., Mutangadura-Mhlanga,T., Wolczyk,D.F., Hartl,D.L., 1987. Distribution and abundance of insertion sequences among natural isolates of *Escherichia coli*. *Genetics* 115, 51-63.
164. Schembri,M.A., Christiansen,G., Klemm,P., 2001a. FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 41, 1419-1430.
165. Schembri,M.A., Kjaergaard,K., Sokurenko,E.V., Klemm,P., 2001b. Molecular characterization of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Journal of Infectious Diseases* 183, S28-S31.
166. Schembri,M.A., Klemm,P., 2001. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel FimH variants and ramifications for virulence. *Infection and Immunity* 69, 1322-1328.
167. Schembri,M.A., Sokurenko,E.V., Klemm,P., 2000. Functional flexibility of the FimH adhesin: Insights from a random mutant library. *Infection and Immunity* 68, 2638-2646.
168. Selander,R.K., Caugant,D.A., Ochman,H., Musser,J.M., Gilmour,M.N., Whittam,T.S., 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 873-884.
169. Shapero,M.H., Zhang,J., Loraine,A., Liu,W., Di,X., Liu,G., Jones,K.W., 2004. MARA: a novel approach for highly multiplexed locus-specific SNP genotyping using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res.* 32, e181.
170. Shi,R., Otomo,K., Yamada,H., Tatsumi,T., Sugawara,I., 2006. Temperature-mediated heteroduplex analysis for the detection of drug-resistant gene mutations in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by denaturing HPLC, SURVEYOR nuclease. *Microbes. Infect.* 8, 128-135.
171. Siguier,P., Perochon,J., Lestrade,L., Mahillon,J., Chandler,M., 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D32-D36.

172. Sinclair,A., Arnold,C., Woodford,N., 2003. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3620-3622.
173. Snyder,J.A., Haugen,B.J., Buckles,E.L., Lockett,C.V., Johnson,D.E., Donnenberg,M.S., Welch,R.A., Mobley,H.L., 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect. Immun.* 72, 6373-6381.
174. Sokurenko,E.V., Chesnokova,V., Doyle,R.J., Hasty,D.L., 1997. Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin - Differential binding to mannosides and uroepithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17880-17886.
175. Sokurenko,E.V., Chesnokova,V., Dykhuizen,D.E., Ofek,I., Wu,X.R., Krogfelt,K.A., Struve,C., Schembri,M.A., Hasty,D.L., 1998. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8922-8926.
176. Sokurenko,E.V., Courtney,H.S., Abraham,S.N., Klemm,P., Hasty,D.L., 1992. Functional-Heterogeneity of Type-1 Fimbriae of *Escherichia-Coli*. *Infection and Immunity* 60, 4709-4719.
177. Sokurenko,E.V., Courtney,H.S., Maslow,J., Siitonen,A., Hasty,D.L., 1995. Quantitative Differences in Adhesiveness of Type-1 Fimbriated *Escherichia-Coli* Due to Structural Differences in FimH Genes. *Journal of Bacteriology* 177, 3680-3686.
178. Sokurenko,E.V., Courtney,H.S., Ohman,D.E., Klemm,P., Hasty,D.L., 1994. FimH Family of Type-1 Fimbrial Adhesins - Functional-Heterogeneity Due to Minor Sequence Variations Among FimH Genes. *Journal of Bacteriology* 176, 748-755.
179. Sokurenko,E.V., Feldgarden,M., Trintchina,E., Weissman,S.J., Avagyan,S., Chattopadhyay,S., Johnson,J.R., Dykhuizen,D.E., 2004. Selection footprint in the FimH adhesin shows pathoadaptive niche differentiation in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1373-1383.
180. Sokurenko,E.V., Hasty,D.L., Dykhuizen,D.E., 1999. Pathoadaptive mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens. *Trends in Microbiology* 7, 191-195.
181. Sokurenko,E.V., Schembri,M.A., Trintchina,E., Kjaergaard,K., Hasty,D.L., Klemm,P., 2001a. Valency conversion in the type 1 fimbrial adhesin of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 41, 675-686.
182. Sokurenko,E.V., Chesnokova,V., Yeung,A.T., Oleykowski,C.A., Trintchina,E., Hughes,K.T., Rashid,R.A., Brint,J.M., Moseley,S.L., Lory,S., 2001b. Detection of simple mutations and polymorphisms in large genomic regions. *Nucleic Acids Research* 29, art-e111.
183. Sompolinsky,D., Nitzan,Y., Tetry,S., Wolk,M., Vulikh,I., Kern,M.B., Sandvang,D., Hershkovits,G., Katcoff,D.J., 2005. Integron-mediated ESBL resistance in rare serotypes of *Escherichia coli* causing infections in an elderly population of Israel. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 119-122.

184. Soper,S.A., Hashimoto,M., Situma,C., Murphy,M.C., McCarley,R.L., Cheng,Y.W., Barany,F., 2005. Fabrication of DNA microarrays onto polymer substrates using UV modification protocols with integration into microfluidic platforms for the sensing of low-abundant DNA point mutations. *Methods* 37, 103-113.
185. Sorsa,L.J., Dufke,S., Heesemann,J., Schubert,S., 2003. Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infect. Immun.* 71, 3285-3293.
186. Soto,G.E., Hultgren,S.J., 1999. Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly. *Journal of Bacteriology* 181, 1059-1071.
187. Southern,E., Mir,K., Shchepinov,M., 1999. Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* 21, 5-9.
188. Stedtfeld,R.D., Wick,L.M., Baushke,S.W., Tourlousse,D.M., Herzog,A.B., Xia,Y., Rouillard,J.M., Klappenbach,J.A., Cole,J.R., Gulari,E., Tiedje,J.M., Hashsham,S.A., 2007. Influence of dangling ends and surface-proximal tails of targets on probe-target duplex formation in 16S rRNA gene-based diagnostic arrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 380-389.
189. Strerath,M., Marx,A., 2005. Genotyping--from genomic DNA to genotype in a single tube. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44, 7842-7849.
190. Takatsu,K., Yokomaku,T., Kurata,S., Kanagawa,T., 2004. A new approach to SNP genotyping with fluorescently labeled mononucleotides. *Nucleic Acids Res* 32, e60.
191. Teng,C.H., Cai,M., Shin,S., Xie,Y., Kim,K.J., Khan,N.A., Di Cello,F., Kim,K.S., 2005. *Escherichia coli* K1 RS218 interacts with human brain microvascular endothelial cells via type 1 fimbria bacteria in the fimbriated state. *Infect. Immun.* 73, 2923-2931.
192. Till,B.J., Burtner,C., Comai,L., Henikoff,S., 2004. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acids Res.* 32, 2632-2641.
193. Tran,P.H., Peiffer,D.A., Shin,Y., Meek,L.M., Brody,J.P., Cho,K.W., 2002. Microarray optimizations: increasing spot accuracy and automated identification of true microarray signals. *Nucleic Acids Res.* 30, e54.
194. Tyagi,S., Bratu,D.P., Kramer,F.R., 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* 16, 49-53.
195. Urwin,R., Maiden,M.C., 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11, 479-487.
196. van Ijperen,C., Kuhnert,P., Frey,J., Clewley,J.P., 2002. Virulence typing of *Escherichia coli* using microarrays. *Mol. Cell Probes* 16, 371-378.
197. Vandemaele,F., Vandekerchove,D., Vereecken,M., Derijcke,J., Dho-Moulin,M., Goddeeris,B.M., 2003. Sequence analysis demonstrates the conservation of fimH and variability of fimA throughout avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research* 34, 153-163.

198. Vandemaele, F.J., Hensen, S.M., Goddeeris, B.M., 2004. Conservation of deduced amino acid sequence of FimH among *Escherichia coli* of bovine, porcine and avian disease origin. *Veterinary Microbiology* 101, 147-152.
199. Velasco, M., Horcajada, J.P., Mensa, J., Moreno-Martinez, A., Vila, J., Martinez, J.A., Ruiz, J., Barranco, M., Roig, G., Soriano, E., 2001. Decreased invasive capacity of quinolone-resistant *Escherichia coli* in patients with urinary tract infections. *Clin. Infect. Dis.* 33, 1682-1686.
200. Vetsch, M., Puorger, C., Spirig, T., Grauschopf, U., Weber-Ban, E.U., Glockshuber, R., 2004. Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst. *Nature* 431, 329-333.
201. Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E., Jimenez, d.A., 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2477-2479.
202. Vila, J., Simon, K., Ruiz, J., Horcajada, J.P., Velasco, M., Barranco, M., Moreno, A., Mensa, J., 2002. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? *J. Infect. Dis.* 186, 1039-1042.
203. Wang, J., Kawde, A.N., Jan, M.R., 2004. Carbon-nanotube-modified electrodes for amplified enzyme-based electrical detection of DNA hybridization. *Biosens. Bioelectron.* 20, 995-1000.
204. Wang, X., Ghosh, S., Guo, S.W., 2001. Quantitative quality control in microarray image processing and data acquisition. *Nucleic Acids Res.* 29, E75.
205. Webber, M., Piddock, L.J., 2001. Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 32, 275-284.
206. Weissman, S.J., Chattopadhyay, S., Aprikian, P., Obata-Yasuoka, M., Yarova-Yarovaya, Y., Stapleton, A., Ba-Thein, W., Dykhuizen, D., Johnson, J.R., Sokurenko, E.V., 2006. Clonal analysis reveals high rate of structural mutations in fimbrial adhesins of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 59, 975-988.
207. Weissman, S.J., Moseley, S.L., Dykhuizen, D.E., Sokurenko, E.V., 2003. Enterobacterial adhesins and the case for studying SNPs in bacteria. *Trends Microbiol.* 11, 115-117.
208. Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., III, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L., Donnenberg, M.S., Blattner, F.R., 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 17020-17024.
209. Wick, L.M., Rouillard, J.M., Whittam, T.S., Gulari, E., Tiedje, J.M., Hashsham, S.A., 2006. On-chip non-equilibrium dissociation curves and dissociation rate constants as methods to assess specificity of oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* 34, e26.

210. Wirth,T., Falush,D., Lan,R., Colles,F., Mensa,P., Wieler,L.H., Karch,H., Reeves,P.R., Maiden,M.C., Ochman,H., Achtman,M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136-1151.
211. Wizemann,T.M., Adamou,J.E., Langermann,S., 1999. Adhesins as targets for vaccine development. *Emerging Infectious Diseases* 5, 395-403.
212. Wold,A.E., Mestecky,J., Tomana,M., Kobata,A., Ohbayashi,H., Endo,T., Eden,C.S., 1990. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect. Immun.* 58, 3073-3077.
213. Wu,X.R., Sun,T.T., Medina,J.J., 1996. In vitro binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: Relation to urinary tract infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9630-9635.
214. Yamamoto,S., Terai,A., Yuri,K., Kurazono,H., Takeda,Y., Yoshida,O., 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12, 85-90.
215. Yang,Q., Lishanski,A., Yang,W., Hatcher,S., Seet,H., Gregg,J.P., 2003. Allele-specific Holliday junction formation: a new mechanism of allelic discrimination for SNP scoring. *Genome Res.* 13, 1754-1764.
216. Yoshida,H., Bogaki,M., Nakamura,M., Nakamura,S., 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1271-1272.
217. Yu,X., Susa,M., Knabbe,C., Schmid,R.D., Bachmann,T.T., 2004. Development and validation of a diagnostic DNA microarray to detect quinolone-resistant *Escherichia coli* among clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4083-4091.
218. Yu,X., Susa,M., Weile,J., Knabbe,C., Schmid,R.D., Bachmann,T.T., 2007. Rapid and sensitive detection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from urine samples using a genotyping DNA microarray. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 417-429.
219. Zhang,Y., Kaur,M., Price,B.D., Tetradis,S., Makrigiorgos,G.M., 2002. An amplification and ligation-based method to scan for unknown mutations in DNA. *Hum. Mutat.* 20, 139-147.
220. Zhou,G., Mo,W.J., Sebbel,P., Min,G., Neubert,T.A., Glockshuber,R., Wu,X.R., Sun,T.T., Kong,X.P., 2001. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J. Cell Sci.* 114, 4095-4103.
221. Zhou,W., Du,W., Cao,H., Zhao,J., Yang,S., Li,W., Shen,Y., Zhang,S., Du,W., Zhang,X., 2004. Detection of *gyrA* and *parC* mutations associated with ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* by use of oligonucleotide biochip technology. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5819-5824.

5.2. Abkürzungsverzeichnis

Für die Bezeichnung der Aminosäuren und Nukleotide wurden in dieser Arbeit die gängigen Einbuchstaben-Abkürzungen verwendet. Alle physikalischen Größen wurden in SI-Einheiten angegeben. Die weiteren in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen waren:

ABU	Asymptomatische Bakteriurie
AE	Absolute Einheit
APEC	Vogelpathogene <i>Escherichia coli</i>
AS	Aminosäure
B	Signalintensität des Hintergrunds
bp	Basenpaare
BSD	Standardabweichung des Hintergrunds
CV	Variationskoeffizient
Cy3	Carbocyanin 3
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOR	Escherichia coli-Referenzstamm
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
ExPEC	Extraintestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>
F	Signalintensität
FSD	Standardabweichung der Signalintensität
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie
HWI	Harnwegsinfektion
kDa	Kilodalton
MHK	Minimale Hemmkonzentration
µTAS	Micro Total chemical Analysis System
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
MM	Mismatch
MNEC	Meningitis assoziierte <i>Escherichia coli</i>
mRI	Mittlere relative Intensität
MW	Mittelwert
nSR	Nettosignalreduktion
nt	Nukleotid
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHK	Positive Hybridisierungskontrolle
PM	Perfect Match
PMT	Photomultiplier Tube
POC	Point-of-Care
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RI	Relative Intensität
SH	Signalintensität nach Hybridisierung
SK	Spottingkontrolle
SNP	Single nucleotide polymorphism
SR	Absolute Signalreduktion
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
SSPE	Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA
SV	Signalintensität nach Verdau
UPEC	Uropathogene <i>Escherichia coli</i>

5.3. *fimH*-Sequenzen

Die Sequenzen der *fimH*-Varianten der 70 *fimH*-positiven ECOR Stämme wurden in öffentlich zugänglichen Datenbanken publiziert. Die Zugangsnummern in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sind EF192321 bis EF192390, wobei die ECOR6 *fimH*:IS 1-Variante unter der Zugangsnummer EF192326 zugänglich ist.

Im Folgenden sind die weiteren *fimH*-Teilsequenzen der klinischen Isolate, die nicht in öffentlichen Datenbanken abgelegt wurden, in alphabetischer Reihenfolge der entsprechenden Isolatsbezeichnung aufgeführt.

>764

```
GGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGCGGTG
GCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGTCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTCGA
CGAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTA
TGGCGGCGTGTTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCTACCACCAGC
GAAACGCCGCGGTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTG
AGCAGTGGGGCGGGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATTTTGCAGACACCAACAA
CTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGC
TGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCCTCTTACCG
TTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTT
TCACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGTA
```

>10413

```
TTGCTGTAAGTGTGATGGGCTGGTGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTA
TCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGTCGCGTGAATGTGGGGCAAACCTG
GTCGTGGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCATAACGATTACCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGC
AACGAGGTTCCGGCTTATGGCGGCGTGTTATCTAGTTTTCCGGGACCGTAAAAATATAATGGCAGTAGCTATC
CTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCG
CTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGGGGGGGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATT
TTGCGACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG
TGGTGGCAGTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCCAG
TGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAG
ATGCGGGCAACTCGATTTTCACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTGGCGTACAGTTGACG
CGCAACGG
```

>39350

```
TTTGTGTAAGTGTGATGGGCTGGTGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCT
ATTCTATTGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGTCGCGTGAATGTGGGGCAAACCTG
GTCGTAGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGC
AACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAAATATAAGTGGCAGTAGCTATC
CATTTCCGACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCG
CTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGGGGTGGGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATT
TTGCGACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG
TGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCATGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCCAG
TGCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAG
ATGCGGGCAACTCGATTTTCACCAATACCGCGTCGTTTTACCCAGCGCAGGGCGTGGCGTACAGTTGACG
CGCAACGGTACGATT
```

>177115

```
GTTTGTGTAAGTGTGATGGGCTGGTGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGC
TATTCCTATTGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGTCGCGTGAATGTGGGGCAAACCT
GGTCTAGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGC
CAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAAATATAAGTGGCAGTAGCTAT
CCATTTCCGACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGC
GCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGGGGTGGGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATT
TTTGCAGACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTG
GTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCATGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCCAG
GTGCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCA
GATGCGGGCAACTCGATTTTCACCAATACCGCGTCGTTTTACCCAGCGCAGGGCGTGGCGTACAGTTGAC
GCGCA
```

Anhang

>A152

TGGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTG
GCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTGCA
CGCAAATCTTTTGCATAACGATTACCCAGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTGGCTTA
TGGCGGCGTGTATCTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGC
GAAACGCCGCGGGTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCGGT
GAGCAGTGGCGGGGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACA
ACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCG
GCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTA
CCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGGGGCAACTCG
ATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCG

>A173

GiTTGCTGTACTGCTGATGGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGC
TATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCT
GGTCGTAGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTG
CAACGAGGCTCGGCTTATGGCTGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATC
CATTTCGACACCAGCGAAACGCCGCGCGTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCG
CTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGGGGCGGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATT
TTGCGACAGACCAACAACACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG
TGGTGCCTACTGGCGGTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAG
TGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAG
ATGGCGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGC
GCAACGGTACGATT

>ABU12

TTTGCTGTACTGCTGATGGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCA
ATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTG
GTCGTAGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCATAACGATTACCCAGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGC
AACGAGGTTCCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATC
CTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGTG
CTTTATTTGACGCCGTGAGCAGTGGGGGGGAGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATT
TTGCGACAGACCAACAACACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG
TGGTGCCTACTGGCGGTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAG
TGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTATCCGGCACAACCGCAG
ATGGCGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACG
CGCAACGGTACG

>ABU16

TTTGCTGTACTGCTGATGGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCT
ATCCCTATTGGTGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGTCGTGAATGTGGGGCAAACCTG
GTCGTAGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGC
AACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATC
CATTTCGACACCAGCGAAACGCCGCGGGTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCG
CTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGGGGCGGGGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATT
TTGCGACAGACCAACAACACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG
TGGTGCCTACTGGCGGTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAG
TGCCAATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAG
ATGGCGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCCAGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACG
CGCAACGGTACGATT

>ABU20

TGCTGATGGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTG
GTGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGTCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATC
TTTGCAGCAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTC
GGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACC
ACCAGCGAAACGCCGCGGGTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGAC
GCCTGTGAGCAGTGGCGGCGGGGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGA
CCAACAACACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTAC
TGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCC
TCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGGGGCAA
CTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCCAGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGTA
CGATT

>ABU21

AATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGTGGTGGCAGCGCTAATGTT
 TATGTAAACCTTGGCCTGTCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTCGACGCAAATCTTTTGCC
 ATAACGATTATCCGGAAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTAT
 CTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGCGAAACGCCGCGGG
 TTGTTTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGC
 GGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACATAACAGCGAT
 GATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTG
 CTCGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAAGTGCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA
 AAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCGATTTCACCAATACCGC
 GTCGTTTTACACGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGT

>ABU27

AATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTT
 TATGTAAACCTTGGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTCGACGCAAATCTTTTGC
 CATAACGATTACCCAGAAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGGCAGCGTGTAT
 CTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGG
 TTGTTTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCGGTGAAGCAGTGCGGGG
 GGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACATAACAGCGAT
 GATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGTGATGTTTCTG
 CTCGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAAGTGCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA
 AAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTATCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCGATTTCACCAATACCGC
 GTCGTTT

>ABU37

ATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTT
 ATGTAAACCTTGGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTCGACGCAAATCTTTTGC
 ATAACGATTACCCAGAAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGGCAGCGTGTATC
 TAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGT
 TGTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCGGTGAAGCAGTGCGGGGG
 GAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACATAACAGCGATGA
 TTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGTGATGTTTCTG
 CGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAAGTGCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAA
 GCCAAAACCTGGGGTATTACCTATCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCGATTTCACCAATACCGCGT
 CGTTT

>ABU38

TGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGTGGTGGCAGCGCTAATGTTT
 TGTAAACCTTGGCCTGTCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTCGACGCAAATCTTTTGC
 AACGATTATCCGGAAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCT
 AATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGCGAAACGCCGCGGGT
 GTTTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGCGG
 GGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACATAACAGCGATGAT
 TTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTC
 GTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAAGTGCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAA
 GCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCGATTTCACCAATACCGCGT
 GTTTTACACGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGT

>ABU57

AATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGTGGTGGCAGCGCTAATGTT
 TATGTAAACCTTGGCCTGTCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTCGACGCAAATCTTTTGC
 ATAACGATTATCCGGAAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTAT
 CTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGCGAAACGCCGCGGG
 TTGTTTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGC
 GGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACATAACAGCGAT
 GATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTG
 CTCGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAAGTGCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA
 AAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCGATTTCACCAATACCGC
 GTCGTTTTACACGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGT

Anhang

>ABU62

GCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTAT
GTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCCAT
AACGATTATCCGGAACCAATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCT
AATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGCGAAACGCCGCGGTT
GTTTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGCGG
GGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAACATAACAGCGATGAT
TTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTC
GTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAG
CCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCGCGTC
GTTTTACACAGCGCAGGGCGTCGGCG

>ABU63

GCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTAT
GTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCCAT
AACGATTACCCGGAACCAATTACAGATTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCT
AATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGTT
GTTTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGGG
AGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAACATAACAGCGATGAT
TTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCT
CGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAG
GCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCGCGT
CGTTTTACCTGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGT

>ABU64

GTTGCTGTACTGCTGATGGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGC
TATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCT
GGTTCGTGGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCCATAACGATTACCCGGAACCAATTACAGACTATGTCACACTG
CAACGAGGTTCCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAGTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTAT
CCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTTGTTTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGC
GCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGGGGAGTGGCGATTAAAGCAGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTAT
TTTGCAGACGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTG
GTGGTGCCCACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCA
GTGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCA
GATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCGCGTCGTTTTACCCG

>ABU83972

AATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTT
TATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTGACGCAAATCTTTTGCC
CATAACGATTACCCAGAAACCAATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGGCAGCGTGTAT
CTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGG
TTGTTTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCGGTGTGAGCAGTGCGGGG
GGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAACATAACAGCGAT
GATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGTGATGTTTCTG
CTCGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA
AAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTATCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCGC
GTCGTT

>B04058

TTTGCTGTACTGCTGATGGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCT
ATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTG
GTCGTAGATCTTTGACGAAAATCTTTTGCCATAACGATTATCCGGAAACCAATTACAGACTATGTCACACTGC
AACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATC
CATTTCCGACCACCAGCGAAACGCCGCGCTTGTGTTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCG
CTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGGGGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATT
TTGCGACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG
TGGTGCCTACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTTCA
TGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAG
ATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGC
GCAACGGTACGATT

>B10490

GGGctGGTcGGTAAaTGCCTGGTCATTcGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATTGGCGGTGG
 CAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCCTGCGCTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGAC
 GAAAATCTTTTGCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTAT
 GGCGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGC
 GAAACGCCGCGCGTGTGTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTG
 AGCAGTGCGGGCGGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCAGACAGACCAACAAC
 TATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCT
 GTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCCT
 TTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCCGAGATGCGGGCAAACCTCGATTTT
 CACCAATACCCGCTCGTTTTACACCTGC

>B19062

TTGCTGAACTGCTGATGGGCTGGTCGTAATGCCTGGTCATTcGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTA
 TCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCCGTCGTGAATGTGGGGCAAACCTG
 GTCGTGGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGC
 AACGAGGCTCGGCTTATGGCGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATC
 CATTTCCTACCACAGCGAAACGCGCGCGTGTGTTATAATTCGAGAACGGATAAGTCGTGGCCGGTGGCG
 CTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGCGGGGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATT
 TTGCGACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG
 TGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAG
 TGCCAATTCCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCCGAG
 ATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCCGCTCGTTTTCACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGC
 GCAACGGTACGA

>BEN79

TTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTT
 GCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAACGATTAC
 CCAGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGGCTGCGTGTATCTAGTTTTCCG
 GGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTGTGTTATAATTC
 GAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCGGTGGCAGTGCAGTGCAGGGGGGAGTGGCGATT
 AAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGGCAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTG
 TGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCA
 CCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCT
 GGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCCGAGATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCCGCTCGTTTTACC
 CGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGTACGATTAT

>BEN374

TGGTCATTcGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTA
 AACCTTGCCTGCGCTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAAC
 GATTACCCAGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAGT
 TTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTGTGTT
 ATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCGGTGGCAGTGCAGGGGGGAGT
 GGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCAGACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTT
 CAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGT
 GATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGC
 CAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCCGAGATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCCGCTCG
 TTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGTACGATTAT

>BEN2908

TTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTT
 GCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAACGATTAC
 CCAGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAGTTTTCCG
 GGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCCGCGGGTGTGTTATAATTC
 GAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCGGTGGCAGTGCAGGGGGGAGTGGCGATT
 AAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCAGACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTG
 TGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTAGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCA
 CCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCT
 GGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCCGAGATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCCGCTCGTTTTACC
 CGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGTACGATTAT

Anhang

>C25

TCGGTAAATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGCACTGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCC
AATGTTTATGTAAACCTTGCGCCCGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTTCGACGCAAATC
TTTTGCCATAACGATTACCCGGAACCAATTACAGATTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGC
GTGTTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAAGTAAAACG
CGCGGTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGT
GCGGGCGGGGTGGTGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAACATAAC
AGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCTGCGAT
GTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCCCTCTTACCGTTTATT
GTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTACC
AATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGTACgA

>F11

AAATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGT
TTATGTAAACCTTGCGCCGTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTG
CCATAACGATTACCCGGAACCAATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGGCGGCGTGT
ATCTAGTTTTTCCGGGATCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAAAACGCCGCG
GTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGGCGG
GGGAGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAACATAACAGCGA
TGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCTGTGATGTTTCT
GCTCGTGATGTCACCGTTACTTTGCCGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCCCTCTTACCGTTTATTGTGCGA
AAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACCG
CGTGGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGG

>P42

TAAATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATG
TTTATGTAAACCTTGCGCCGTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTG
CCATAACGATTATCCGGAACCAATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGT
ATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCCTACCACAGCGAAAACGCCGCG
CGTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGGCG
GCGGGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAACATAACAGCG
ATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCTGCGATGTTT
TGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCCCTCTTACCGTTTATTGTGCG
AAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACC
GCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGT

>RZ422

GCTGGTGGTAAATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGCGGTGGCA
GCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTTCGACG
AAATCTTTTCCATAACGATTACCCGGAACCAATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGG
CGGCGTGTATCTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAA
ACGCCGCGGGTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAG
CAGTGCGGGGGAGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAACATA
TAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCTG
TGATTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTTTGCCGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCCCTCTTACCGTT
TATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTT
ACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGT

>RZ479

TGTAAGTCTGATGGGCTGGTGGTAAATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCC
TATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGT
GGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTCCATAACGATTACCCGGAACCAATTACAGACTATGTCACACTGCAACGA
GGTTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCC
CTACTACCAGCGAAAACCGCCGCGGGTTGTTTATAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATT
TGACGCCTGTGAGCAGTGGCGGGGGAGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTGCGA
CAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGC
CCACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTTTGCCGACTACCCTGGTTCAGTGCCGA
TTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGG
GCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAAC
GGTA

>RZ505

GCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGCGGTGGCA
 GCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTGACGCG
 AAATCTTTTGCCATAACGATTACCCGGAACCAATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGG
 CGGCGTGTTATCTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAA
 ACGCCGCGGGTTGTTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAG
 CAGTGCAGGGGGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAATA
 TAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCTG
 TGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTTTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCCCTCTTACCGTT
 TATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTC
 ACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCCGGCTACAGTT

>RZ532

GTTTGCTGTAAGTGTGATGGGCTGGTCGTAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGC
 TATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCT
 GGTGCGTGGATCTTTGACGCGAAATCTTTTGCCATAACGATTACCCGGAACCAATTACAGACTATGTCACACTG
 CAACGAGGTTCCGGCTTATGGCGCGTGTTATCTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTAT
 CCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCGCGGGTTGTTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGC
 GCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGGGGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTAT
 TTTGCGACAGACCAACAATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTG
 GTGGTGCCCACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTTTGCCGGACTACCCTGGTTCA
 GTGCCGATTCCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCA
 GATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCCGGCTACAGTTGAC
 GCGCAACGGTACGATT

>S6

GTTTGCTGTAAGTGTGATGGGCTGGTCGTAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGC
 AATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCT
 GGTGCTAGATCTTTGACGCGAAATCTTTTGCCATAACGATTACCCAGAAACCAATTACAGACTATGTCACACTG
 CAACGAGGTTCCGGCTTATGGCGCGTGTTATCTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTAT
 CCTTTCCCTACTACCAGCGAAACGCGCGGGTTGTTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGC
 GCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGGGGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTAT
 TTTGCGACAGACCAACAATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTG
 GTGGTGCCCACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCA
 GTGCCGATTCCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCA
 GATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCCGGCTACAGTTGAC
 GCGCAACGGTACGATT

>S39

GTTTGCTGTAAGTGTGATGGGCTGGTCGTAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGC
 TATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCT
 GGTGCTAGATCTTTGACGCGAAATCTTTTGCCATAACGATTATCCGGAACCAATTACAGACTATGTCACACTG
 CAACGAGGCTCGGCTTATGGCTGCGTGTTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAAGTGGCAGTAGCTATC
 CATTTCCGACCACCAGCGAAACGCGCGCGTGTGTTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCG
 CTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGGGGAGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTAT
 TTGCGACAGACCAACAATAAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG
 TGGTGCCCACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCA
 TGCCGATTCCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAG
 ATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCCGGCTACAGTTGACGC
 GCAACGGTA

>S44

GCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGC
 AGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTGACGCG
 CAAATCTTTTGCCATAACGATTACCCAGAAACCAATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATG
 GCGGCGTGTTATCTAGTTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGA
 AACGCCGCGGGTTGTTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCGGTGA
 GCAGTGCGGGGGGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAATA
 ATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCCACTGGCGGCT
 GCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCCCTCTTACCG
 TTTATTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTT
 TCACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCCGGCTACAGTT

Anhang

>S48

ATACTGCTGATGGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGCACCGCTATCCCT
ATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGT
GGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAACGATTACCCGAAACCATTACAGATTATGTCACACTGCAACGA
GGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCC
CGACCACAGTAAACGCCGCGGGTGTATAATTTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTAT
TTGACGCTGTGAGCAGTGCGGGCGGGTGGTGATTAAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTATTTTTGCGA
CAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGC
CCACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGA
TTCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGG
GCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAAC
GGTACGA

>S49

GGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTG
GCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGA
CGCAAATCTTTTGCCATAACGATTACCCAGAACCCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTTCGGCTTA
TGGCAGCGTGTATCTAGTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGC
GAAACGCCGCGGGTGTATAATTTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCGGT
GAGCAGTGCGGGGGAGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTATTTTTGCGACAGACCAACA
ACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGGCCACTGGCG
GCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTAC
CGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTATCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGAT
TTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCG

>S55

GCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGTGGtGGCA
GCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGACGC
AAATCTTTTGCCATAACGATTATCCGGAACCCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGG
CGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGCGAA
ACGCCGCGGGTGTATAATTTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCTGTGAG
CAGTGCGGGCGGGTGGCGATTAAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACATA
TAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGGCTACTGGCGGCTG
CGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCCTCTTACCGTT
TATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTC
ACCAATACCGCGTCGTTTTACAGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTA

>S87

GCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACTGCTATCCCTATTGGCGGTGGCA
GCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTTCGACGC
AAATCTTTTGCCATAACGATTACCCGGAACCCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTTCGGCTTATGG
CGGCGTGTATCTAGTTTTCCGGGACCGTAAAATATAATGGCAGTAGCTATCCTTTCCCTACTACCAGCGAA
ACGCCGCGGGTGTATAATTTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCTGTGAG
CAGTGTGGCGGGTGGCGATTAAAGCTGGTTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACATA
TAACAGCGATGATTTTCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGGCCACTGGCGGCTGT
GATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCGTTT
ATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTCA
CCAATACCGCGTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGT

>U12587

ACCGCCAATGGCACCGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCGCCGT
GAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTGCCATAACGATTACCCGGAACCCAT
TACAGATTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAA
ATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACAGTAAACGCCGCGGGTGTATAATTTCGAGAACGGA
TAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCTGTGAGCAGTGCGGGCGGGTGGTGATTAAAGCTGGCT
CATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATT
TACGCCAATAATGATGTGGTGGTGGCCACTGGCGGCTGCGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTG
CCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTAC
CTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGG
CGTCGGCGTACAGTTGACG

>U12633

AAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGGCGCTGCCG
TGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTGACGAAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCAT
TACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAA
ATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGCGAAAACGCCGCGCTTGTATAATTGAGAACGGA
TAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGGGGCGGGGTGGCAATTAAGCTGGCT
CATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATT
TACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTG
CCGGACTACCCTGGTTCAAGTGCCGATTCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTAC
CTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTAC

>U12740

TGCTGATGGGCTGGTTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATTG
GCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGAT
CTTTGACGAAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCT
CGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGAC
CACCAGCGAAAACGCCGCGCTTGTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGAC
GCCTGTGAgCAGTGCGGGCGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGAC
CAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACT
GGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGACTACCCTGGTTCAAGTGCCGATTCT
CTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAC
TCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACG

>U15156

CTGCTGATGGGCTGGTTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATT
GGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGA
TCTTTGACGAAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGC
TCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGA
CCACCAGCGAAAACGCCGCGCTTGTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTG
ACGCCTGTGAGCAGTGGGGCGGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCAGACA
GACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCT
ACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGACTACCCTGGTTCAAGTGCCGATT
CCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGC
AACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGT
ACGA

>U15451

ACTGCTGATGGGCTGGTTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTAT
TGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAG
ATCTTTGACGAAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGG
CTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCG
ACCACCAGCGAAAACGCCGCGCTTGTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTT
GACGCCTGTGAGCAGTGGGGCGGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCAGAC
AGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGC
TACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGACTACCCTGGTTCAAGTGCCGAT
TCCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGG
CAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACG
GTACGATT

>U15672

ACTGCTGATGGGCTGGTTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTAT
TGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAG
ATCTTTGACGAAAATCTTTTGCATAACGATTATCCGGAAACCATACAGACTATGTCACACTGCAACGAGG
CTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCG
ACCACCAGCGAAAACGCCGCGCTTGTATAAATTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTT
GACGCCTGTGAGCAGTGGGGCGGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCAGAC
AGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGC
TACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGACTACCCTGGTTCAAGTGCCGAT
TCCTCTTACCCTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGG
CAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACG
GTACGATT

Anhang

>U15762

CTGCTGATGGGCTGGTCCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATT
GGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTTCGTAGA
TCTTTTCGACGAAAATCTTTTCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGC
TCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGA
CCACCAGCGAAACGCCGCGCTTTGTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTG
ACGCCTGTGAGCAGTGGCGGCGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTTCGACA
GACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCT
ACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATT
CCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGC
AACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGT
ACGAATATTC

>U15822

ACTGCTGATGGGCTGGTCCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTAT
TGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTTCGTAG
ATCTTTTCGACGAAAATCTTTTCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGG
CTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCG
ACCACCAGCGAAACGCCGCGCTTTGTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTT
GACGCCTGTGAGCAGTGGCGGCGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTTCGAC
AGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCT
TACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGAT
TCCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGC
CAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACG
GTACGA

>U17709

CTGCTGATGGGCTGGTCCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATT
GGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTTCGTAGA
TCTTTTCGACGAAAATCTTTTCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGC
TCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCG
CCACCAGCGAAACGCCGCGCTTTGTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTG
ACGCCTGTGAGCAGTGGCGGCGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTTCGACA
GACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCT
ACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATT
CCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGC
AACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGT
A

>U19010

TTTGCTGACTGCTGATGGGCTGGTCCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCT
ATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTG
GTCGTAGATCTTTTCGACGAAAATCTTTTCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGC
AACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATC
CATTTCCGACCACCAGCGAAACGCCGCGCTTTGTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCG
CTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGGCGGCGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATT
TTGCGACAGACCAACAACATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGG
TGGTGCCTACTGGCGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAG
TGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAG
ATGCGGGCAACTCGATTTTACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCG
GCAACGGTACGA

>U19264

GGTCCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGC
GCTAATGTTTATGTAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTTCGTAGATCTTTTCGACGAAA
ATCTTTTCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCG
GCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGCGAAAC
GCCGCGCGTGTGTTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCA
GTGCGGGCGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTTCGACAGACCAACAACATA
ACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGCGGCTGTG
ATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCGTTA
TTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTTCAC
CAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAA

>U19310

CTGATGGGCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATTGGC
 GGTGGCAGCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTT
 TCGACGAAAATCTTTTCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGG
 CTTATGGCGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCAC
 CAGCGAAAACGCCGCGCTTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGC
 CTGTGAGCAGTGC GGCGGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCA
 ACAACTATAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGG
 CGGCTGTGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCT
 TACCGTTTATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTC
 GATTTTCACCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACGCGCAACGGTACGAT
 T

>U23741

GCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTcgccTGTA AAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAG
 CGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGACGAA
 AATCTTTTCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGC
 GGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGCGAAA
 CGCCGCGCGTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGC
 AGTGC GGCGGGGTGGCAATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACA ACTAT
 AACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGT
 GATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCGTTT
 ATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTCA
 CCAATACCGCGTCGTTTTACCTGCACAGGGCGTCGGCGTACAGTT

>U24421

GCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATTGGCGGTGGCA
 GCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCCGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGACGC
 AAATCTTTTCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGG
 CGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCTACCACCAGCGAA
 ACGCCGCGCGTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAG
 CAGTGC GGCGGGGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACA ACTA
 TAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTG
 TGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCCTCTTACCGTT
 TATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTC
 ACCAATACCGCGTCGTTTTACCAGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTT

>U33041

GCTGGTCGGTAAATGCCTGGTCATTGCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACAGCTATCCCTATTGGCGGTGGCA
 GCGCTAATGTTTATGTAAACCTTGCGCCCGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGACGC
 AAATCTTTTCCATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGG
 CGGCGTGTATCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCTACCACCAGCGAA
 ACGCCGCGCGTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAG
 CAGTGC GGCGGGGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTTATTTTGCACAGACCAACA ACTA
 TAACAGCGATGATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTG
 TGATGTTTCTGCTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCCTCTTACCGTT
 TATTGTGCGAAAAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTC
 ACCAATACCGCGTCGTTTTACCAGCGCAGGGCGTCGGCGTACAGTTGACG

>UR888

AATGCCTGGTCATTGCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTT
 TATGTAAACCTTGCGCCCGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTTCGACGCAAATCTTTTGC
 CATAACGATTACCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCGGCTTATGGCGGCGTGTGTA
 TCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAATATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCTACCACCAGCGAAAACGCCGCGG
 GTTGTATAATTGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCTGGC
 GGGGTGGCGATTAAGCTGGCTCATTAAATTGCCGTGCTAATTTTGCACAGACCAACA ACTATAACAGCGAT
 GATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGTGATGTTTCTG
 CTCGTGATGTCACCGTTACTCTGCCGGACTATCCCGTTCCGGTCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGA
 AAAGCCAAAACCTGGGGTTTTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAACTCGATTTTCACCAATACCG
 CGTCGTTTTACCGCGCAGGGCGT

Anhang

>UR1365

AATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCAATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTT
TATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTGACGCAAATCTTTTGC
CATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGTTCCGGCTTATGGCGGCGTGTTA
TCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAAATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACCACCAGTGAAACGCCGCGC
GTTGTTTATAATTTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGG
CGGGGTGGCGATTAAAGCTGGTTCATTAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAATTATAACAGCGAT
GATTTTCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTG
CTCGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA
AAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCGC
CTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCG

>UR1469

AATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACCGCTATTCCTATTGGCGGTGGCAGCGCTAATGTT
TATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTAGATCTTTGACGCAAATCTTTTGC
CATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCCGGCTTATGGCGGCGTGTTA
TCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAAATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCGACTACCAGCGAAACGCCGCGG
GTTGTTTATAATTTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGGT
GGGGTGGCGATTAAAGCTGGTTCATTAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAACCTATAACAGCGAT
GATTTCCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTG
CTCATGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCAATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA
AAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCGC
GTCGTTTTACCCAGCGCAGGGCGTCGGCG

>UR1520

AATGCCTGGTCATTTCGCCTGTAAAACCGCCAATGGTACTGCTATCCCTATTGGCGGTGGCAGCGCCAATGTT
TATGTAAACCTTGGCGCTGCCGTGAATGTGGGGCAAACCTGGTCGTGGATCTTTGACGCAAATCTTTTGC
CATAACGATTATCCGGAAACCATTACAGACTATGTCACACTGCAACGAGGCTCCGGCTTATGGCGGCGTGTTA
TCTAATTTTTCCGGGACCGTAAAAATAGTGGCAGTAGCTATCCATTTCCCTACCACCAGCGAAACGCCGCGG
GTTGTTTATAATTTCGAGAACGGATAAGCCGTGGCCGGTGGCGCTTATTTGACGCCTGTGAGCAGTGCGGG
CGGGGTGGCGATTAAAGCTGGTTCATTAATTGCCGTGCTTATTTGCGACAGACCAACAATTATAACAGCGAT
GATTTTCAGTTTGTGTGGAATATTTACGCCAATAATGATGTGGTGGTGCCTACTGGCGGCTGCGATGTTTCTG
CTCGTGATGTCACCGTACTCTGCCGGACTACCCTGGTTCAGTGCCGATTCTCTTACCGTTTATTGTGCGAA
AAGCCAAAACCTGGGGTATTACCTCTCCGGCACAACCGCAGATGCGGGCAAACCTCGATTTTCACCAATACCGC
CTCGTTTTACCCGCGCAGGGCGTCGGCG

6. Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

6.1. Publikationen

- T. Barl, U Dobrindt, X Yu, D Katcoff, E Bingen, J Hacker, TT Bachmann
Genotyping DNA chip for the simultaneous assessment of antibiotic resistance and pathogenicity potential of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, eingereicht
- T. Barl, U Dobrindt, D Katcoff, E Bingen, J Hacker, TT Bachmann
Genotyping pathoadaptive mutations in the type 1 fimbriae binding-subunit of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* with a DNA microarray, eingereicht

6.2. Patentantrag

- Timo Barl, Till T. Bachmann
Improving allele specific DNA/DNA hybridization on surface by the employment of a mismatch specific nuclease

6.3. Konferenzbeiträge

- 5. Deutsches BioSensor Symposium, Bochum 2007
T. Barl, U. Dobrindt, J. Hacker, T.T. Bachmann
Vortrag: „Genotyping DNA Microarray for the Simultaneous Detection of Pathoadaptive Mutations and Quinolone Resistance in *Escherichia coli*“
- 3rd Annual AMT conference, Edinburgh, UK 2007
DM Leinberger, T. Barl, V Grimm, X Yu, A Henn, M Rubtsova, M Susa, C Knabbe, U Dobrindt, J Hacker, RD Schmid, TT Bachmann
Poster: “Towards multiparametric diagnostics of infectious diseases using DNA microarrays in the clinic”
- 9. Statusseminar Chiptechnologien, Frankfurt 2007
T. Barl, U. Dobrindt, J. Hacker, T.T. Bachmann
Poster: „Genotyping DNA Microarray for the Simultaneous Detection of Pathoadaptive Mutations and Quinolone Resistance in *Escherichia coli*“
- 20. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft, Bonn 2006
T. Barl, U. Dobrindt, J. Hacker, R.D. Schmid, T.T. Bachmann
Poster: „Genotyping DNA chip for the assessment of pathogenicity and antibiotic resistance potential of recurrent *E. coli* urinary tract infections“
- International Symposium of Urinary Tract Infections, Weimar 2006
T. Barl, U. Dobrindt, J. Hacker, R.D. Schmid, T.T. Bachmann
Poster: „Genotyping DNA chip for the assessment of pathogenicity and antibiotic resistance potential of recurrent *E. coli* urinary tract infections“
- 8. Statusseminar Chiptechnologien, Frankfurt 2006
T. Barl, U. Dobrindt, J. Hacker, R.D. Schmid, T.T. Bachmann
Poster: „Genotyping DNA chip for the assessment of pathogenicity potential of recurrent *E. coli* urinary tract infections“

Veröffentlichungen

- 2nd European Conference on Prokaryotic Genomes, Göttingen 2005
T. Barl, U. Dobrindt, J. Hacker, R.D. Schmid, T.T. Bachmann
Poster: „Detecting allele variations of the FimH subunit in *E. coli* with DNA microarrays“

Danksagung

An erster Stelle möchte ich **Prof. Dr. Rolf D. Schmid** für die Möglichkeit danken, am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart promovieren zu dürfen. Für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut, sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, das Referat für diese Arbeit zu übernehmen, bin ich ihm sehr verbunden.

PD Dr. Till T. Bachmann danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, für zahlreiche Anregungen und Diskussionen, für die Korrektur dieser Arbeit, für seine Bereitschaft, das Koreferat für diese Arbeit zu übernehmen und nicht zuletzt auch für die Gelegenheit, an der Division of Pathway Medicine in Edinburgh meine Arbeit abschließen zu können.

Prof. Dr. Jörg Hacker danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit, seine Unterstützung in den drei Jahren der gemeinsamen Kooperation, sowie seine Bereitschaft, mich am IMIB einzustellen und mich an die DPM nach Edinburgh zu entsenden. Insbesondere bin ich **PD Dr. Ulrich Dobrindt** für seinen Einsatz, ohne den meine Einstellung am IMIB nicht möglich gewesen wäre, für die exzellente Kooperation während der beiden Projektphasen, für viele gute Antworten auf meine nie endenden Fragen, für Anregungen, hervorragende und konstruktive Hinweise und nicht zuletzt auch für die vielen DNA-Proben dankbar. Schließlich möchte ich auch **Barbara Plaschke** für ihre Mühe bei der Isolierung der zahlreichen Proben danken.

Dem **BMBF** danke ich für die Finanzierung der beiden Projekte, an denen ich arbeiten durfte. Außerdem bin ich dem **DAAD** für die finanzielle Unterstützung während meines Aufenthalts in Edinburgh dankbar. Ich möchte auch den Projektpartnern **Prof. Dr. Wolfgang Witte**, **Prof. Dr. Cornelius Knabbe** und **Prof. Dr. Wolfgang Ludwig** für ihre kritischen Anregungen während der Projekttreffen danken. **Prof. Dr. Edouard Bingen**, **Dr. Don Katcoff** und **Dr. Klaus Schröppel** danke ich für die Bereitstellung der Isolate.

Prof. Peter Ghazal danke ich für die Einladung an die DPM. Ebenso bin ich **Holger** dankbar, dass er mir beim Einleben in Edinburgh so sehr geholfen hat, für seine großzügige Gastfreundschaft, die Hilfe im neuen Institut und die vielen eindrucksvollen Momente in Schottland außerhalb des Labors. Ebenso möchte ich mich bei **Julie**, **Alan** und **Petter** für die Unterstützung im neuen Labor danken. **Kevin** danke ich für die Korrektur der englischsprachigen Zusammenfassung dieser Arbeit. **Silvia** möchte ich für ihre engagierte und hervorragende Arbeit am Phylotyping-Microarray danken.

Prof. Dr. Peter Heisig danke ich für die hilfreichen Anregungen zwecks der isogenen resistenten Stämme. Für den Hinweis auf die ECOR-Datenbank bin ich **Prof. Dr. Peter Kuhnert** sehr dankbar. **Prof. Dr. Kurt Naber** möchte ich für sein Entgegenkommen bei der Publikation der Integration der beiden Microarrays danken.

Schließlich möchte ich den Mitarbeitern am ITB, insbesondere der Arbeitsgruppe Bioanalytik danken - ein großes MERCI an **Kristina**, **Dirk**, **Beate**, **Verena**, **Harald** und **Susi**, ohne die vieles im Labor vor allem zu Beginn der Arbeit viel schwerer gewesen wäre. **Xiaolei** möchte ich für die Vorarbeiten am *gyrA*-Microarray danken. Ebenso danke ich **Jan**, **Jan**, **Tina** und **Claudia** für ihre Unterstützung im Labor. **Dirk** bin ich für die Sequenzierungen sehr dankbar. **Karin** und **Timo** möchte ich für die Überlassung des Referenzstammes W3110 danken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, meinen **Eltern** für die unglaubliche Hilfe und Unterstützung in vielfältiger Art und Weise während der letzten Jahre zu danken. **Svenja**, dir danke ich von ganzem Herzen, dass du für mich da bist und dass du meinem Aufenthalt in Edinburgh zugestimmt hast (IXV). **Matthias** danke ich für den Druck dieser Arbeit und für Miles & More. Schließlich möchte ich **Carmen**, **Sarah**, **Dietmar**, Svenjas Familie und allen guten Freunden danken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und ertragen haben und für die vielen schönen Momente in Stuttgart und Edinburgh außerhalb der Universität, die diesen Lebensabschnitt für mich unvergesslich machen.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name	Timo Barl
Geburtstag	29. April 1978
Geburtsort	Speyer

SCHULAUSBILDUNG

1994 - 1997	Gymnasium Weierhof (Bolanden)
1990 - 1994	Deutsche Schule Tokyo Yokohama (Japan)
1988 - 1990	Hans-Purmann-Gymnasium (Speyer)
1984 - 1988	Grundschule Otterstadt

ZIVILDIENTST

Aug. 97 - Aug. 98	Arbeiter-Samariter-Bund Grünstadt/Eisenberg
-------------------	---------------------------------------------

STUDIUM

Okt. 04 - Dez 07	Promotionsstudium am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart, „DNA-Microarrays zur Identifizierung von pathoadaptiven Mutationen und Antibiotikaresistenzen in extraintestinal pathogenen <i>Escherichia coli</i> (ExPEC)“
Jul. 04	Abschluss des Diploms
Sep. 03 - Jul. 04	Diplomarbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart; „Metabolische Stoffflussanalyse im Zellzyklus von <i>S. cerevisiae</i> “
Okt. 02 - Mär. 03	Studienarbeit am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart; „Gerichtete Evolution von 2,4-D spezifischen Antikörpern“
Feb. 02 - Apr. 02	Industriepraktikum bei der BASF AG, Abteilung Forschung Feinchemikalien & Biokatalyse / Biotransformationen; „Enzymkatalysierte Synthese von Amiden“
Okt. 00	Abschluss des Vordiploms
Okt. 98 - Jul. 04	Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit Mär. 07	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg
Seit Feb. 07	Forschungsaufenthalt an der Division of Pathway Medicine an der University of Edinburgh, UK
Okt. 04 - Feb. 07	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart