

**Entwicklung zellulärer und molekularbiologischer
Testsysteme zur Bestimmung der Aktivität von
Fluorchinolonen auf Typ II-Topoisomerasen am Beispiel von
Pradofloxacin – einem neuen
C8-Cyanofluorchinolon**

Dissertation

**zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Barbara Körber-Irrgang

aus

Bonn

Hamburg 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2000 bis Februar 2005 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig in der Abteilung für Pharmazeutische Mikrobiologie am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn und in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Joachim Thiem

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernward Bisping

Tag der Disputation: 18.11.2005

Für Ralf und meine Eltern

Einige Dinge kann man messen, um sie zu werten.

Andere muss man erfahren.

(unbekannter Verfasser)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Antibiotika und Resistenzentwicklung	1
1.2	Chinolone – Struktur-Wirkungs-Beziehungen.....	4
1.3	Topoisomerasen und ihre Rolle in der DNA-Organisation.....	8
1.4	Wirkungsweise von Chinolonen	14
1.5	Bakterielle Resistenzmechanismen gegenüber Chinolonen.....	19
1.6	Gründe und Lösungsansätze für das Chinolonresistenz-Problem.....	20
1.7	Pradofloxacin – ein neues C8-Cyanofluorchinolon	21
1.8	Ziel der Arbeit	22
2.	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Bakterienstämme	24
2.1.2	Plasmide	25
2.1.3	Oligonukleotide.....	26
2.1.4	Antibiotika.....	29
2.1.5	Nährmedien	30
2.1.6	Chemikalien	30
2.1.7	Enzyme.....	32
2.1.8	Puffer und Lösungen	33
2.1.9	Sonstige Materialien und Geräte	35
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Methoden der Mikrobiologie	37
2.2.1.1	Übernachtskultur.....	37
2.2.1.2	Anlegen und Ausimpfen einer Glycerinkultur	37
2.2.1.3	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	38
2.2.1.4	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	38
2.2.1.5	Bestimmung der optimalen bakteriziden Konzentration.....	39
2.2.1.6	Absterbekinetiken.....	40
2.2.1.7	Mikroskopischer Nachweis zellmorphologischer Veränderungen.....	42
2.2.1.8	Identifizierung grampositiver Bakterien mit API ID32 Staph.....	42

2.2.1.9	Selektion Chinolon resistenter Mutanten	43
2.2.1.10	Stabilität der Mutationen	44
2.2.2	Methoden der Molekulargenetik.....	44
2.2.2.1	Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden	44
2.2.2.1.1	Herstellung von Oligonukleotiden.....	44
2.2.2.1.2	OPC-Reinigung von Oligonukleotiden.....	46
2.2.2.1.3	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden	46
2.2.2.2	Isolierung von chromosomaler DNA.....	47
2.2.2.2.1	DNA-Isolierung aus gramnegativen Bakterien.....	47
2.2.2.2.2	DNA-Isolierung aus grampositiven Bakterien.....	47
2.2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA	48
2.2.2.3.1	Plasmid-Minipräparation nach Birnboim und Doly (modifiziert).....	48
2.2.2.3.2	Plasmid-Minipräparation nach QIAGEN	48
2.2.2.3.3	Plasmid-Midipräparation nach QIAGEN	49
2.2.2.4	DNA-Amplifikationstechniken.....	50
2.2.2.4.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	50
2.2.2.4.2	PCR-Fusions-Technik (SOEing)	52
2.2.2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	53
2.2.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten bzw. DNA-Fragmenten.....	54
2.2.2.6.1	DNA-Aufreinigung durch Verwendung von Silika-Säulen (QIAGEN)..	54
2.2.2.6.2	Isolierung von DNA aus Gelen nach QIAGEN	54
2.2.2.7	Enzymatische DNA-Modifikation	55
2.2.2.7.1	Restriktionsverdau	55
2.2.2.7.2	Dephosphorylierung.....	56
2.2.2.7.3	Ligation geschnittener Fragmente mittels T4-Ligase	57
2.2.2.7.4	Ligation von PCR-Fragmenten mittels Topoisomerase I	57
2.2.2.8	Übertragung von genetischem Material.....	59
2.2.2.8.1	Herstellung kompetenter Bakterien nach der CaCl ₂ -Methode	59
2.2.2.8.2	Transformation von CaCl ₂ kompetenten Zellen	59
2.2.2.9	Sequenzierung.....	60
2.2.2.10	Screening auf Luciferaseaktivität	62

2.2.2.11	Bestimmung der minimalen SOS-induzierenden Konzentration (minimal SOS-inducing concentration, MSIC).....	63
2.2.2.12	Bestimmung der minimalen Cleavage-Konzentration (CC ₁₀) von Fluor- chinolonen für pro- und eukaryontische Typ II-Topoisomerasen	66
2.2.2.12.1	Cleavage-Assay mit Gyrase.....	66
2.2.2.12.2	Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV	67
2.2.2.12.3	Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II.....	68
3.	Ergebnisse	69
3.1	Bestimmung der Wirksamkeit von Fluorchinolonen auf zellulärer Ebene	69
3.1.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Fluorchinolonen gegenüber genetisch definierten Stämmen	69
3.1.2	Selektion Fluorchinolon resistenter Mutanten	72
3.1.3	Bestimmung der bakteriziden Mechanismen von Fluorchinolonen mit Hilfe genetisch definierter Stämme	79
3.1.3.1	Ermittlung der optimalen bakteriziden Konzentration.....	79
3.1.3.2	Absterbekinetiken.....	82
3.2	Bestimmung der Wirksamkeit von Fluorchinolonen auf molekularer Ebene	90
3.2.1	Wirkung von Fluorchinolonen auf isolierte Zielstrukturen.....	90
3.2.2	Entwicklung eines Reportergensystems zur Bestimmung der minimalen effektiven Chinolonkonzentration für die SOS-Induktion	95
3.2.2.1	Konstruktion des Reportergensystems	95
3.2.2.1.1	Amplifikation des <i>recA</i> -Promotors und des <i>luc</i> -Gens.....	95
3.2.2.1.2	Konstruktion der <i>precA-luc</i> -Fusion mittels SOEing PCR.....	97
3.2.2.1.3	Subklonierung in pCR2.1-TOPO	100
3.2.2.1.4	Charakterisierung rekombinanter <i>precA-luc</i> -pCR2.1-TOPO-Klone.....	100
3.2.2.1.5	Charakterisierung der rekombinanten <i>precA-luc</i> -pCR2.1-TOPO- Plasmide	101
3.2.2.1.6	Transformation des Plasmids pPHB441 in <i>E. coli</i> ER1821	103
3.2.2.1.7	Luciferaseaktivitätsscreening mit <i>E. coli</i> ER1821-pPHB441-Transfor- manden	103

3.2.2.1.8	Sequenzanalyse von pPHB441-Plasmiden aus <i>E. coli</i> ER1821-Transformanden	105
3.2.2.1.9	Vorbereitung des <i>precA-luc</i> -Fragments und des Vektors für die Umklonierung in pBR322.....	105
3.2.2.1.10	Klonierung in pBR322.....	106
3.2.2.1.11	Charakterisierung der rekombinanten pBR322- <i>precA-luc</i> -Plasmide	106
3.2.2.1.12	Bestimmung der Orientierung des <i>precA-luc</i> -Fusionsgens in pBR322-Konstrukten	107
3.2.2.1.13	Luciferaseaktivitätsscreening mit <i>E. coli</i> ER1821 pPHB341-/pPHB342-Transformanden.....	109
3.2.2.1.14	Sequenzierung des gesamten <i>precA-luc</i> -Fragments	110
3.2.2.1.15	Transformation von pPHB341 und pPHB342 in <i>E. coli</i> WT, WT-4, WT-3-1 und WT-K.....	110
3.2.2.1.16	Luciferaseaktivitätsscreening mit <i>E. coli</i> WT, WT-4, WT-3-1 und WT-K Klonen	111
3.2.2.2	Optimierung des Testsystems für die Bestimmung der spezifischen Luciferaseaktivität	114
3.2.2.2.1	Bestimmung der MHK-Werte gegenüber den <i>E. coli</i> Stämmen WT, WT-4, WT-3-1 und WT-K in Anwesenheit des Reporterplasmids pPHB342	114
3.2.2.2.2	Bestimmung des optimalen Volumenverhältnisses von Luciferase-Assay-Reagent und Bakterienlysat zur Bestimmung der Luciferaseaktivität	115
3.2.2.2.3	Bestimmung der spezifischen Luciferaseaktivität	116
3.2.2.2.4	Einfluss von Glucose und Induktionszeit auf die Bestimmung der spezifischen Luciferaseaktivität.....	118
3.2.3	Bestimmung der minimalen SOS induzierenden Konzentration von Fluorchinolonen.....	120
3.2.4	Filamentierung von <i>E. coli</i> Zellen unter Fluorchinoloneinwirkung	125
3.2.5	Bestimmung der minimalen SOS induzierenden Konzentration von Fluorchinolonmetaboliten.....	128
3.2.6	Wechselwirkung von Fluorchinolonen mit humaner Topoisomerase II	130

4.	Diskussion	134
4.1	Vergleichende mikrobiologische Untersuchungen zur Bestimmung der Wirkung von Pradofloxacin auf zellulärer Ebene	134
4.1.1	Effekt von Pradofloxacin auf Wildtyp- und Mutantenstämme häufiger Infektionserreger	136
4.1.1.1	Aktivität von Pradofloxacin gegenüber Wildtypstämmen und definierten Topoisomerasemutanten von <i>E. coli</i>	136
4.1.1.2	Aktivität von Pradofloxacin gegenüber definierten, hochresistenten <i>E. coli</i> Stämmen mit Topoisomerasemutationen und einer verringerten Fähigkeit zur Akkumulation von Fluorchinolonen	137
4.1.1.3	Aktivität von Pradofloxacin gegenüber Wildtypstämmen und definierten Topoisomerasemutanten von <i>S. aureus</i> und <i>S. intermedius</i>	139
4.1.2	Bevorzugte Zielstruktur und Selektionspotential von Pradofloxacin ...	140
4.1.2.1	Bevorzugte Zielstruktur von Pradofloxacin in <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> und <i>S. intermedius</i>	141
4.1.2.2	Selektionspotential von Pradofloxacin.....	144
4.1.3	Bakterizide Wirkungstypen von Pradofloxacin	147
4.1.3.1	Bakterizide Mechanismen von Pradofloxacin.....	148
4.1.3.2	Einfluss von Topoisomerasemutationen auf die Anzahl zusätzlicher bakterizider Mechanismen von Pradofloxacin.....	150
4.1.3.3	Mögliche molekulare Effekte für das Auftreten bakterizider Mechanismen	151
4.2	Vergleichende molekularbiologische Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität von Pradofloxacin	153
4.2.1	Wechselwirkung von Pradofloxacin mit isolierten prokaryontischen Zielstrukturen	154
4.2.1.1	Eignung des CC ₁₀ -Wertes für die Bestimmung der Aktivität von Fluorchinolonen auf bakterielle Zielstrukturen.....	155
4.2.1.2	Aktivität von Pradofloxacin auf Gyrase und Topoisomerase IV	157
4.2.2	Induktion der SOS-Antwort durch Pradofloxacin.....	159
4.2.2.1	Entwicklung des In-vivo-Testsystems (<i>preA-luc</i> -Reporterassay) .	161
4.2.2.2	Optimierung des In-vivo-Testsystems.....	162
4.2.2.3	Bestimmung der MSIC von Pradofloxacin	164

4.2.2.4	Beeinflussung der SOS-Induktion durch verschiedene Faktoren	166
4.2.2.5	Anwendungsmöglichkeiten des In-vivo-Testsystems.....	169
4.2.3	Wechselwirkung von Pradofloxacin mit humaner Topoisomerase II....	170
4.2.3.1	Eignung des CC ₁₀ -Wertes für die Bestimmung der Aktivität von Fluor- chinolonen auf humane Topoisomerase II	172
4.2.3.2	Aktivität von Pradofloxacin auf humane Topoisomerase II.....	173
4.3	Ausblick.....	178
5.	Zusammenfassung / Summary	180
6.	Literatur	183
7.	Anhang.....	213
7.1	Densitometrische Gelauswertung zur Bestimmung des CC ₁₀ -Wertes von Fluorchinolonen in DNA-Cleavage-Assays mit Gyrase	213
7.2	Densitometrische Gelauswertung zur Bestimmung des CC ₁₀ - Wertes von Fluorchinolonen in DNA-Cleavage-Assays mit Topoisomerase IV	218
7.3	Densitometrische Gelauswertung zur Bestimmung des CC ₁₀ -Wertes von Fluorchinolonen in DNA-Cleavage-Assays mit humaner Topo- isomerase II.....	223
8.	Abkürzungsverzeichnis	228

Danksagung

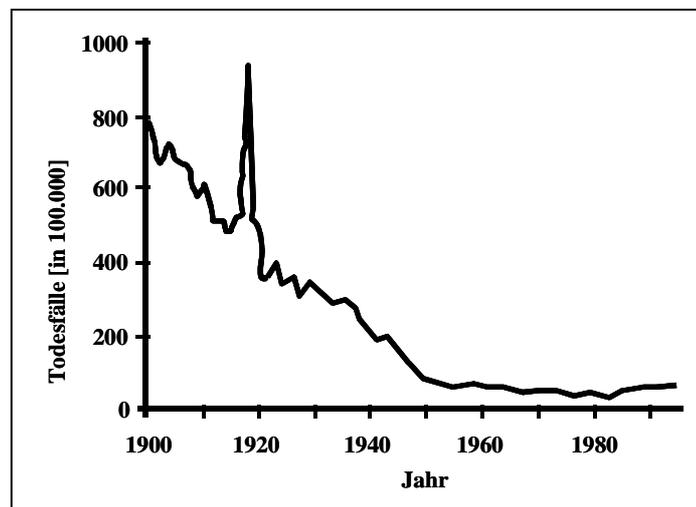
Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Antibiotika und Resistenzentwicklung

Infektionskrankheiten gefährden seit Jahrtausenden die Gesundheit von Menschen, Tieren und Pflanzen. Noch zu Beginn des letzten Jahrhunderts stellten sie die häufigste Todesursache der Menschen dar (54). Dabei konnten 30% der Todesfälle auf bakteriell verursachte Infektionen zurückgeführt werden (Diarrhoe, Pneumonie und Tuberkulose). In den folgenden Jahrzehnten konnte die Situation durch vorbeugende Maßnahmen wie die Änderung von Hygienestandards (39) und die Einführung der aktiven und passiven Immunisierung entscheidend verbessert werden. Der deutlichste Fortschritt zur Bekämpfung bakterieller Infektionserreger wurde jedoch durch die Entdeckung bzw. den Einsatz von Antibiotika erzielt (*Abbildung 1.1*). Durch den Einsatz dieser Substanzen konnten viele bakteriell verursachte Krankheiten behandelt und geheilt werden.

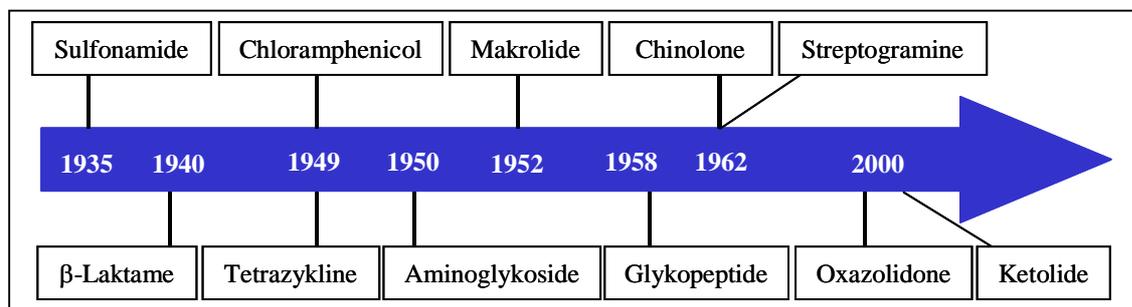
Abbildung 1.1: Durch Infektionen hervorgerufene Todesfälle in den USA von 1900-1996 (54)



Die Erwartung, dass Infektionen durch die Behandlung mit Antibiotika zukünftig keine Rolle mehr spielen würden, erfüllte sich jedoch bislang nicht. Kurz nach dem Beginn der Ära der Antibiotika Therapie 1935 (Einführung des ersten Sulfonamids Prontosil) (234, 240) – insbesondere aber nach der Einführung des ersten β -Laktams Penicillin

1940 – wurde auch das Auftreten erster Antibiotika resistenter Bakterien beschrieben (3). Um der Ausbreitung resistenter Bakterien entgegenzuwirken, wurde seitdem eine Reihe neuer Wirkstoffe mit bekanntem Wirkungsmechanismus entwickelt (z.B. neue β -Laktam-Derivate). Darüber hinaus wurde die Suche nach neuen bakteriellen Zielstrukturen für Antibiotika forciert, so dass in den letzten 70 Jahren eine Vielzahl neuer Antibiotika-Klassen entdeckt (388) bzw. entwickelt wurden (**Abbildung 1.2**).

Abbildung 1.2: Zulassung neuer Antibiotika-Klassen für die antimikrobielle Therapie (modifiziert nach Walsh, 2003)



Trotz aller Bemühungen ließ sich das Resistenzproblem meist nur für kurze Zeit lösen. Nach der Einführung neuer Substanzen aus bekannten bzw. neuen Antibiotika-Klassen wurden immer wieder Bakterien isoliert, die gegenüber den neuen Wirkstoffen unempfindlich waren (bakterielle Resistenz), auch wenn die Zeitspannen zwischen der Zulassung der Antibiotika und dem Auftreten von resistenten Bakterien dabei variierten (73). Die Gründe für die Resistenzentwicklung sind vielfältig. Zu den Hauptursachen des häufigen Auftretens von Antibiotikaresistenzen zählen die ausgeprägte genetische Variabilität (durch Mutation, Rekombination, Transposition) und die Mechanismen des interzellulären Gentransfers (Konjugation, Transformation, Transduktion) von Bakterien (174). Ein weiteres Problem stellt das Verschreiben dieser Medikamente ohne medizinische Notwendigkeit dar, zum Beispiel beim Vorliegen von viralen und nicht von bakteriellen Infektionen (417). Darüber hinaus können Antibiotika in einigen europäischen Ländern verschreibungsfrei von jedermann erworben werden (79), was zur Selbstmedikation ohne medizinische Kenntnis führt. Die unsachgemäße Anwendung von Antibiotika durch den Patienten bzw. in der Veterinärmedizin durch den Tierhalter ist ebenso problematisch. Häufig werden Antibiotika zu niedrig oder zu kurz dosiert, so dass sich resistente Bakterien entwickeln können. Ein weiteres Thema ist die Anwendung von

Antibiotika in der Tierhaltung als Wachstumsförderer (359). Im Jahr 2000 dienten nur 20% der in der Landwirtschaft eingesetzten Antibiotika veterinärmedizinischen Zwecken, 80% wurden zur Leistungsverbesserung verabreicht (79). Letzteres ist besonders problematisch, sofern Antibiotika eingesetzt werden, die identisch oder im chemischen Aufbau ähnlich zu humanmedizinisch verwendeten Antibiotika sind (262, 337). In wie weit der Einsatz solcher Antibiotika als Leistungsförderer einen Effekt auf die Resistenzentwicklung hat, kann am Beispiel von Avoparcin, einem veterinärmedizinisch relevanten Glycopeptid-Antibiotikum, und Enterokokken (Teil der Darmflora in Mensch und Tier) erklärt werden. Wurde Avoparcin über einen längeren Zeitraum zur Leistungsförderung eingesetzt, so konnten aus den entsprechenden Tieren Avoparcin resistente Enterokokken isoliert werden, die darüber hinaus eine Kreuzresistenz zu Vancomycin, einem humanmedizinisch relevanten Glycopeptid-Antibiotikum, aufwiesen (1, 2). Durch den Verzehr von rohem Geflügel- und Schweinefleisch bzw. mangelnde Hygiene bei der Verarbeitung konnten somit Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) auf den Menschen übertragen werden. Studien belegen, dass 1994 alleine 13% der deutschen Bevölkerung gesunde Träger von VRE-Stämmen waren (182). Wurden Infektionen durch diese Stämme hervorgerufen, war eine Behandlung mit Vancomycin nicht mehr möglich. Die Therapie schlug fehl.

Trotz einiger guter Ansätze, wie des Verbots von Antibiotika für den Einsatz in der Tiermast zur Leistungsförderung (308) ist das weltweite Problem der Ausbildung resistenter Bakterien nicht gelöst. Häufig können bereits resistente – insbesondere multiresistente – Bakterien nicht länger mit verfügbaren Antibiotika behandelt werden. Um zum einen diese Erreger bekämpfen zu können und um die Entwicklung von neuen Resistenzen zu verlangsamen, besteht weiterhin ein Bedarf an neuen potenteren Antibiotika (206). Dabei werden verschiedene Strategien verfolgt. Eine Möglichkeit stellt die Entwicklung von Substanzen dar, die die Ausprägung von Resistenzmechanismen verhindern oder die Auslöser einer Resistenz inaktivieren sollen (wie z.B. β -Laktamase-Inhibitoren), so dass die Wirkung bekannter Antibiotika wieder hergestellt wird (197, 277, 358). Weiterhin wird die Suche nach Antibiotika mit neuen Zielstrukturen, wie z.B. Inhibitoren der bakteriellen Fettsäure-, Chorismat-, Lipid A- oder Zellwand-Synthese sowie der DNA-Polymerase III und Peptid-Deformylase, vorangetrieben (27, 37, 61, 302, 322, 398, 423). Einen hohen Stellenwert nimmt nach wie vor jedoch die Entwick-

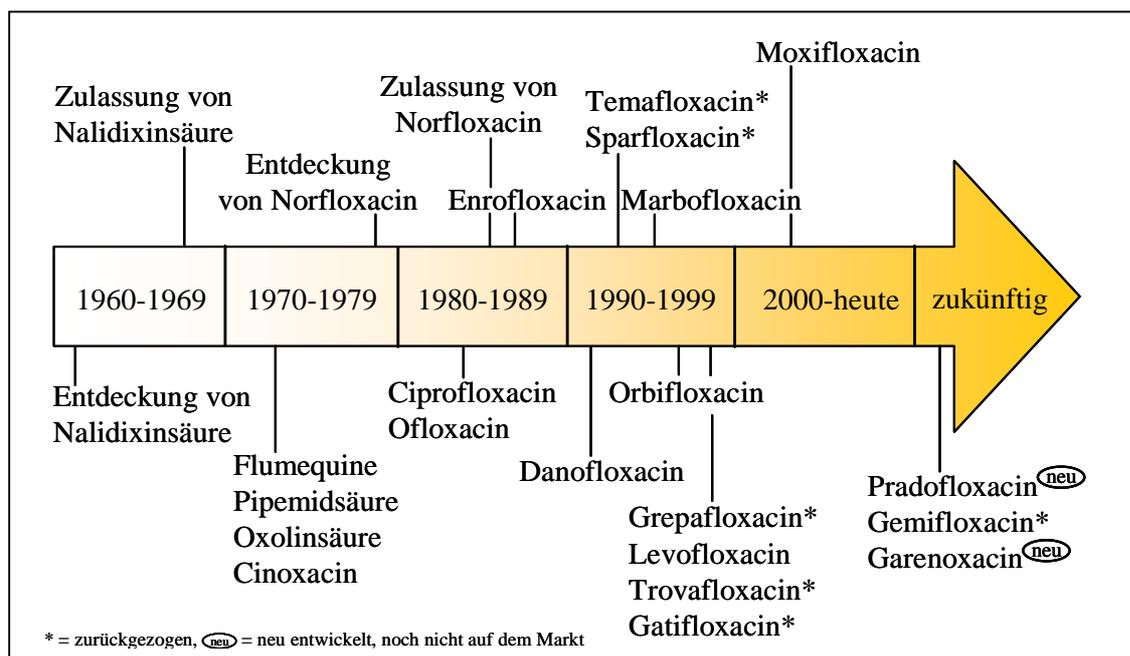
lung neuer Substanzen (z.B. neuer β -Laktam-Derivate), die eine verbesserte Wirkung gegenüber bekannten Zielstrukturen aufweisen sollen, ein. Dieser Trend trifft insbesondere auch für die Antibiotika-Klasse der Chinolone zu (63, 166, 186, 191).

1.2 Chinolone – Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Chinolone gehören heute zu den mit am häufigsten in der antimikrobiellen Chemotherapie eingesetzten Substanzen (17). Für den erhöhten Einsatz der Chinolone – insbesondere der Fluorchinolone – gibt es verschiedene Gründe: die Wirkung auf gramnegative und -positive Erreger (Breitspektrumaktivität), die gute Bioverfügbarkeit, die orale und intravenöse Applikationsmöglichkeit, die guten pharmakokinetischen und -dynamischen Parameter, das geringe Auftreten von Nebenwirkungen (15).

Chinolone sind synthetische, antimikrobiell wirksame Substanzen. Den ersten Vertreter dieser Verbindungsklasse stellte Nalidixinsäure dar. Sie wurde 1962 bei der Suche nach neuen Antimalariamitteln synthetisiert (196). Nach der Zulassung 1967 wurde Nalidixinsäure zur Behandlung von unkomplizierten Harnwegsinfektionen – hervorgerufen durch gramnegative Enterobakterien – eingesetzt (131).

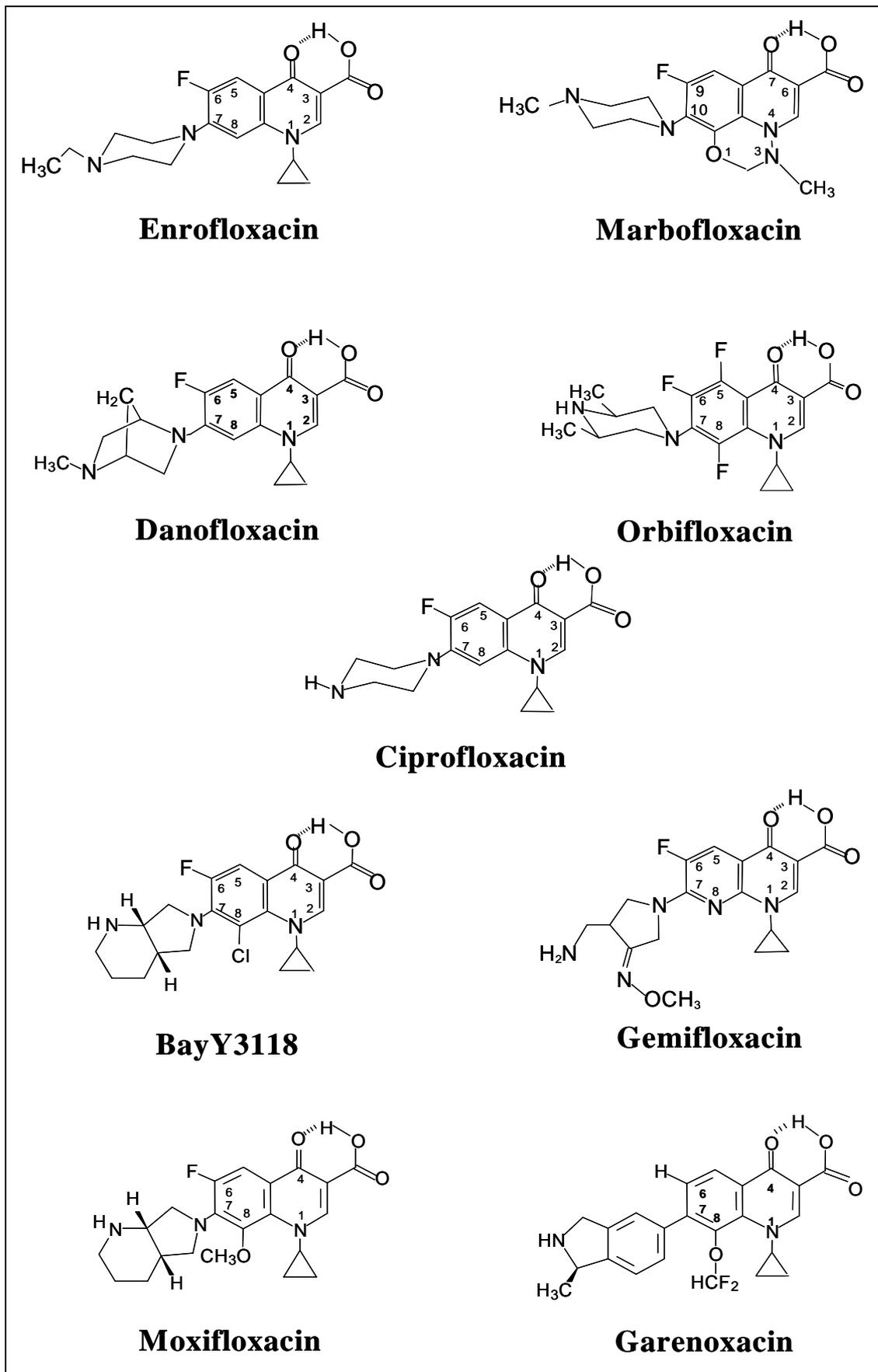
Abbildung 1.3: Entwicklung human- und veterinärmedizinischer Chinolone seit 1962 (modifiziert nach Emmerson et al., 2003)



Anfang der 70er Jahre wurden weitere Chinolone, wie Cinoxacin, Pipemid- und Oxolin-säure zur Behandlung von Harnwegsinfektionen zugelassen (235). Auf Grund des eingeschränkten Wirkungsspektrums dieser Substanzen, der geringen Gewebegängigkeit und der raschen Entwicklung resistenter Bakterien wurde die Gruppe der Chinolone als antibakterielle Chemotherapeutika lange Zeit vernachlässigt. Erst nach der Entwicklung des ersten Fluorchinolons Norfloxacin 1986 wurde den Chinolonen mehr Aufmerksamkeit geschenkt, da Norfloxacin ein breiteres gramnegatives Wirkungsspektrum, eine verlängerte Halbwertszeit und eine geringere Serumproteinbindung zeigte (408). Daraufhin wurde die Entwicklung neuer Chinolone mit breiterem Wirkungsspektrum und weiter verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften vorangetrieben und hält bis heute an (**Abbildung 1.3**).

Für die Verbesserung der antibakteriellen bzw. pharmakokinetischen Eigenschaften der Chinolone wurden verschiedene Modifikationen der chemischen Struktur vorgenommen (115, 421). Im Laufe der Entwicklung der Chinolone hat sich zum einen die Änderung des Grundgerüsts, zum anderen die Variation der Substituenten für die Wirkung einer Substanz als wichtig erwiesen. Der Wechsel des Naphthyridingrundkörpers (Nalidixinsäure) zum Pyrimidopyridon (Pipemidsäure) bzw. Cinnolin (Cinnoxacin) erbrachte zunächst keine wesentliche Aktivitätsverbesserung (131). Den nachfolgend entwickelten Chinolonen liegt in der Regel ein Chinolingrundkörper (Ausnahme: Enoxacin und Gemifloxacin mit einem Naphthyridingrundkörper) zu Grunde, der sich für die Variation von Substituenten am geeignetsten erwiesen hat. Allen Chinolonen gemein ist die Carbonsäuregruppe an C3 und die Oxogruppe an C4. Veränderungen an diesen beiden Positionen führen zum Verlust der antibakteriellen Aktivität. Die Substituenten scheinen daher wichtig für die Interaktionen mit den bakteriellen Zielstrukturen der Chinolone – den Typ II-Topoisomerasen – zu sein (15, 131). Die Fähigkeit der Oxo-Carbonyl-Gruppe zur Komplexbildung von Mg^{2+} -Ionen ist für die Wechselwirkung der Chinolone mit Typ II-Topoisomerase-DNA-Komplexen offensichtlich von Bedeutung (266, 278). Darüber hinaus ist diese funktionelle Gruppierung wichtig für die Membrangängigkeit der Substanzen (51, 106, 110). Durch eine Substitution mit Piperazin an C7 (Pipemidsäure) stieg die orale Verfügbarkeit sowie der antibakterielle Effekt gegenüber gramnegativen Bakterien an. Eine deutliche Erhöhung der Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterien – 10- bis 100-fach – und eine verbesserte Aktivität gegenüber einigen grampositiven Erregern wie *S. aureus* wurde jedoch erst mit der Einführung eines Fluoratoms

Abbildung 1.4: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Fluorchinolone



an C6 (Norfloxacin) erreicht (406). Dies begründete die neue Gruppe der Fluorchinolone (**Abbildung 1.4**).

Durch weitere Substitutionen wurden potentere Fluorchinolone als Norfloxacin entwickelt. So konnte sowohl die Aktivität gegenüber Enterobakterien und *P. aeruginosa* als auch die pharmakokinetischen Eigenschaften durch einen apolaren Rest an N1, wie z.B. eine Cyclopropylgruppe (Ciprofloxacin), gesteigert werden (326).

Um eine verbesserte Wirkung auf grampositive und anaerobe Bakterien zu erzielen und somit nicht nur Harnwegsinfekte, sondern auch Infekte des Respirationstraktes behandeln zu können, wurde eine Vielzahl von neuen Manipulationen an den Seitenketten vorgenommen. Eine der ersten Veränderungen stellte die Addition einer NH₂-Gruppe (Sparfloxacin) oder einer CH₃-Gruppe (Grepafloxacin) an Position C5 dar (93). Spar- und Grepafloxacin zeigten durch die C5-Substituenten zwar einen erhöhten Effekt gegenüber grampositiven Bakterien, gleichzeitig wurde aber auch die Zunahme von nicht tolerierbaren Nebeneffekten – insbesondere cardiotoxischen Effekten – beobachtet (161, 207, 276, 317, 351). Spar- und Grepafloxacin wurden vom Markt zurückgezogen (24, 26). Der Austausch der C7-Piperazingruppe bzw. von C7-Piperazinderivaten (z.B. Methylpiperazin) durch Aminopyrrolidin-Derivate (Gemifloxacin) oder Azabicyclosubstituenten (Moxifloxacin) hatte eine deutliche Zunahme der Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien zur Folge. Darüber hinaus zeichnete sich die Azabicyclogruppe durch eine erhöhte Lipophilie und verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften, wie z.B. eine deutlich verlängerte Halbwertszeit, aus. Die Halbwertszeit von Moxifloxacin beträgt beispielsweise über zehn Stunden (25). Substitutionen an C8 (-OCH₃ in Moxi- und Gatifloxacin, -OCHF₂ in Garenoxacin) spielten eine wichtige Rolle bei der Verbesserung der oralen Verfügbarkeit, der Wirkung auf grampositive und anaerobe Bakterien (6, 33, 83, 425) und für die Erweiterung des Wirkungsspektrums auf Problemkeime wie Mycobakterien (85, 306, 422). Mit der Einführung von C8-Substitutionen konnte zudem das Potential zur Selektion resistenter Bakterien im Vergleich zu früheren Fluorchinolonen, wie z.B. Ciprofloxacin, herabgesetzt (85, 213, 256) und die bakterizide Aktivität gegenüber resistenten Bakterien gesteigert werden (213). Neben den beschriebenen positiven Effekten wurde jedoch herausgefunden, dass Fluorchinolone mit C8-Substituenten phototoxische Effekte in Mensch und Tier hervorrufen können. Das Risiko für die Entwicklung einer Photosensibilität des Patienten ist dabei abhängig von der Struktur des Substituenten. So zeigen Moxi- und Gatifloxacin mit einem C8-Methoxy-

Substituenten ein sehr geringes phototoxisches Potential (83, 220). Substanzen hingegen mit einem C8-Halogenatom wie Fluor (z.B. Sparfloxacin) oder Chlor (BayY3118) besitzen ein sehr hohes phototoxisches Potential (207, 227, 294). BayY3118 wurde unter anderem auf Grund der untolerierbaren Phototoxizität nicht zugelassen, Sparfloxacin auf Grund dieser und anderer Nebenwirkungen sogar vom Markt zurückgezogen.

Vor der Kenntnis der bakteriellen Zielstrukturen der Chinolone wurden nur wenige, geeignete Modifikationen (Grundgerüst, C7-Substituent) zur Verbesserung der Aktivität gefunden. Die meisten und wichtigsten Veränderungen (C6-Fluor, C8-Substituenten, Variation des C7-Substituenten) wurden erst nach der Entdeckung der bakteriellen Targetenzyme Gyrase 1977 und Topoisomerase IV 1990 – beides Typ II-Topoisomerasen – vorgenommen (112, 170, 357).

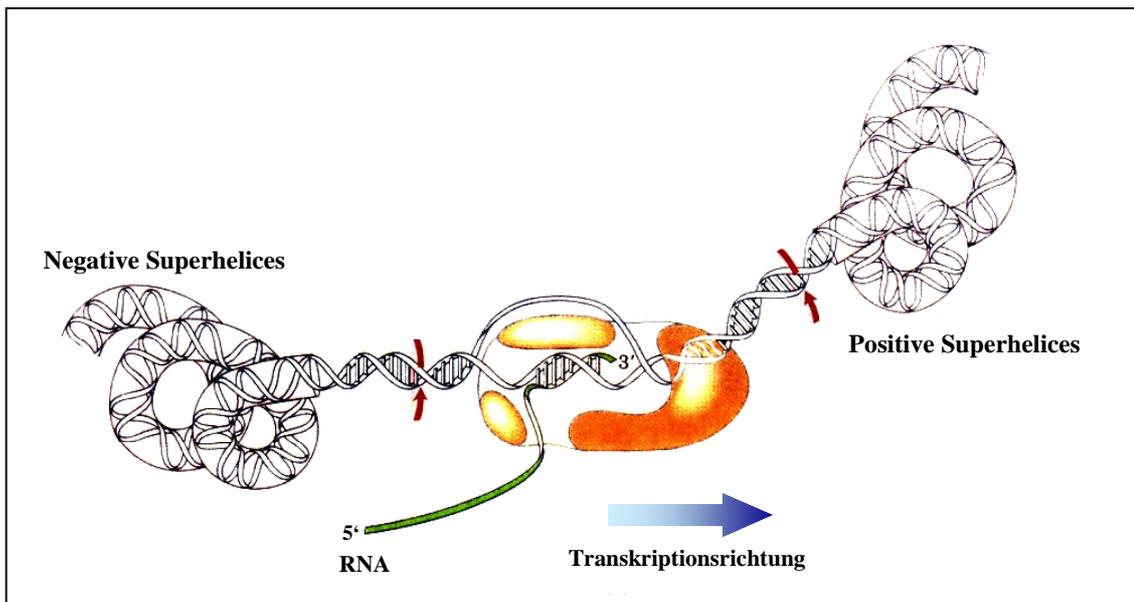
1.3 Topoisomerasen und ihre Rolle in der DNA-Organisation

Topoisomerasen spielen eine wichtige Rolle bei der räumlichen Organisation der DNA in der Zelle sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten. Eine Aufgabe dieser Enzyme ist die Aufrechterhaltung der kompakten superspiralisierten Struktur der DNA. In *E. coli* beispielsweise gelingt die „Verpackung“ des ringförmigen Chromosoms von 1100 μm Länge in eine 1-2 μm lange Zelle nur auf Grund der hohen Verdichtung (1000-fach) der DNA, die durch Topoisomerasen und 12 weitere DNA-bindende Proteine erreicht wird (10). Eine hohe Verdichtung ist zudem wichtig, damit die bakteriellen Tochterchromosomen am Ende der Zellteilung korrekt auf die Tochterzellen verteilt werden können (125, 418, 420).

Ungeachtet der Tatsache, dass sowohl eine negative als auch eine positive Überspiralisierung zu einer Verdichtung (Kondensation) des DNA-Moleküls führt, ist die DNA in Bakterien, Tier- und Pflanzenzellen vorwiegend negativ überspiralisiert. Es wird angenommen, dass die negative Überspiralisierung natürlich vorkommender DNA-Moleküle eine Drehspannung (Torsionsspannung) zur Folge hat, die die Trennung der DNA-Doppelstränge während verschiedener zellulärer Prozesse wie der DNA-Replikation (109, 226), Transkription (19, 59, 269, 297) und Rekombination (246, 259) begünstigt und darüber hinaus zu einer Aufwindung der DNA-Doppelstränge beiträgt (215, 285, 380, 391). Alle genannten, zellulären Prozesse haben topologische Veränderungen zur

Folge. So führt z.B. die fortschreitende Trennung der DNA-Stränge durch die DNA-Helikase während der Replikation und der RNA-Polymerase während der Transkription (**Abbildung 1.5**) zu einer lokalen Akkumulation positiv-überspiralisierter Superhelices vor und negativ-überspiralisierter Superhelices hinter dem jeweiligen Enzym (111, 210, 372, 394).

Abbildung 1.5: Topologische Änderungen während der Transkription (235)



Während der Transkription wird der DNA-Doppelstrang vor der RNA-Polymerase aufgetrennt und aufgewunden und dahinter wieder verschlossen und verwunden (rote Pfeile). Die fortschreitende Trennung der DNA-Stränge durch die RNA-Polymerase führt zu einer lokalen Akkumulation positiv-überspiralisierter Superhelices vor und negativ-überspiralisierter Superhelices hinter dem Enzym.

Um ein Fortschreiten des Replikations- oder RNA-Polymerase-Komplexes zu gewährleisten und den globalen negativ-überspiralisierten Status der DNA aufrechtzuerhalten, müssen positiv-überspiralisierte Superhelices ausgeglichen werden. Ein weiteres topologisches Problem stellt die Trennung der Tochterchromosomen nach der Replikation dar. Ohne die Trennung der beiden miteinander verbundenen Chromosomen ist eine Zellteilung nicht möglich. Neben den oben beschriebenen zellulären Prozessen können Torsionsspannungen der DNA beispielsweise auch durch die Änderung des pH-Wertes, der Salzkonzentration oder der Temperatur hervorgerufen werden (87, 370).

Die aktive Beseitigung von Torsionsspannungen, wie der Entfernung positiver Superhelices zur Aufrechterhaltung eines bestimmten Überspiralisierungsgrades, obliegt alleine

den Topoisomerasen (40). Die Familie der Topoisomerasen kann in zwei Subfamilien eingeteilt werden. Typ I-Topoisomerasen spalten vorübergehend einen der beiden DNA-Stränge der Doppelhelix und bewirken die Passage des intakten Stranges durch den geöffneten Strang (394). Sie sind in der Regel von monomerer Struktur und benötigen während des Reaktionszyklus keine Energie in Form von ATP mit Ausnahme der reversen Gyrase (50, 313). Typ II-Topoisomerasen führen vorübergehend einen Doppelstrangbruch in die DNA ein und katalysieren die Passage desselben oder eines anderen DNA-Moleküls durch die DNA-Lücke (394). Diese Enzyme bestehen aus mehreren Untereinheiten und benötigen ATP als Energiequelle für Konformationsänderungen im Verlaufe eines Reaktionszyklus (273, 312, 356). Typ I- und Typ II-Topoisomerasen lassen sich je nach der Bindung der geschnittenen DNA während der Reaktionszyklen in weitere Subtypen unterteilen. Bei Typ IA, Typ IIA und Typ IIB ist die geschnittene DNA über das DNA 5'-Ende, bei Typ IB über das DNA 3'-Ende kovalent an Tyrosinreste im aktiven Zentrum des jeweiligen Enzyms gebunden (52, 55). Die menschliche Zelle besitzt fünf verschiedene Enzyme, drei Typ I-Topoisomerasen (I, III α , III β) und zwei Typ II-Topoisomerasen (II α , II β). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* konnten hingegen nur zwei Topoisomerasen, ein Typ I- (III) und ein Typ II-Enzym (II), nachgewiesen werden. Daraus ist ersichtlich, dass Anzahl und Typen der in einer Zelle vorkommenden Topoisomerasen spezifisch für einen Organismus sind (55).

E. coli besitzt jeweils zwei verschiedene Typ I- (Topoisomerase I und III) und Typ II-Topoisomerasen (Gyrase und Topoisomerase IV), die unterschiedliche Aufgaben in der Zelle wahrnehmen (34, 75, 394). Während die Rolle der Topoisomerase III in der Aufrechterhaltung der DNA-Topologie nicht geklärt ist (55), sind Topoisomerase I, Gyrase und Topoisomerase IV maßgeblich an der Regulation des Überspiralisierungsgrades beteiligt. Topoisomerase I, die erste Topoisomerase, die aus *E. coli* isoliert wurde (390), ist ein 105 kDa Monomer und wird durch das Gen *topA* codiert (353, 369). Die Hauptaufgabe dieses Enzyms besteht in der Relaxierung lokaler Anhäufungen von negativen Superhelices, die im Verlaufe der Transkription entstehen, und verhindert somit die Bildung von RNA-DNA-Hybriden (R-Loops) mit ungepaarten, nicht für das transkribierte Gen codierenden DNA-Bereichen (298). Deletionsversuche mit *E. coli* Topoisomerase I zeigten, dass deren Aufgabe von Topoisomerase IV übernommen werden kann und sie somit nicht als essentiell gilt (170). Topoisomerase III wird durch das Gen *topB* codiert und besteht aus einem 74 kDa Monomer (80, 81). Das Enzym besitzt keine bekannte

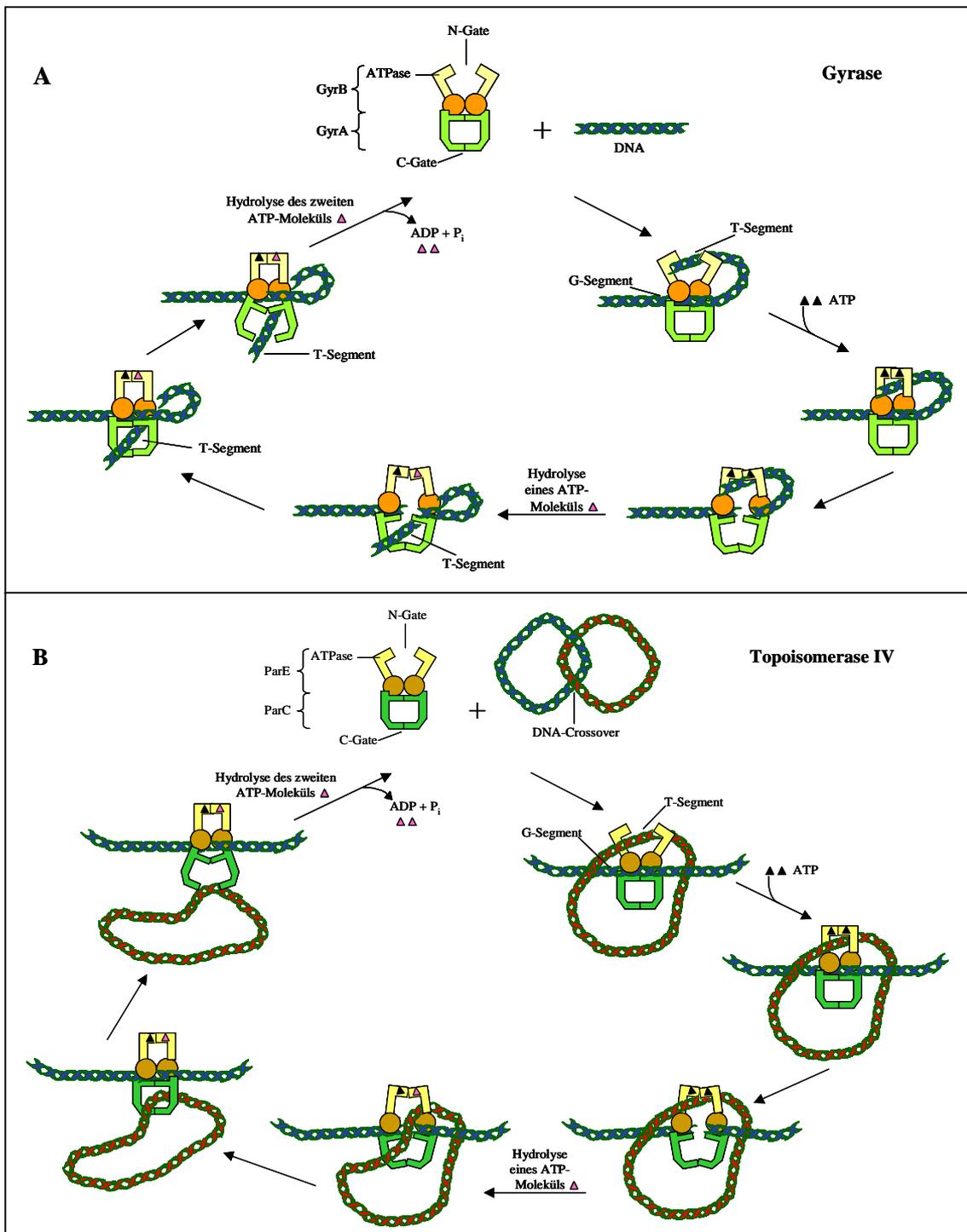
Aufgabe bei der Überspiralisierung der DNA (55). Es wird jedoch angenommen, dass das Enzym eine Rolle bei der Entwindung einzelsträngiger DNA-Knoten spielt, die während der Replikation oder Rekombination auftreten können (80, 135, 136). Zellen ohne dieses Enzym bzw. mit einem deletiertem *topB*-Gen – ursprünglich als Mutator-Allel *mutR* bezeichnet – sind lebensfähig, zeigen jedoch einen Anstieg spontaner Deletionen in der DNA (332, 405). Gyrase weist eine tetramere Struktur auf. Das Enzym besteht aus zwei GyrA- (je 97 kDa) und zwei GyrB-Untereinheiten (je 90 kDa), die von den Genen *gyrA* und *gyrB* codiert werden (112, 357). Gyrase ist als einzige Topoisomerase in der Lage in Anwesenheit von ATP negative Superspiralen in die DNA einzuführen. Das Enzym spielt daher eine wichtige Rolle bei der Entfernung positiver Superspiralen, die während der fortschreitenden Translokation des Replikations- bzw. Transkriptionskomplexes entstehen (113, 126, 340). Topoisomerase IV ist ebenfalls ein tetramerer Proteinkomplex. Das Enzym setzt sich aus zwei ParC-Untereinheiten (je 84 kDa) und zwei ParE-Untereinheiten (je 70 kDa), codiert von den Genen *parC* und *parE*, zusammen (49). Topoisomerase IV ist an der Cytoplasmamembran lokalisiert (170, 216), was wie folgt erklärt werden kann. Da die Hauptaufgabe des Enzyms die Trennung der Tochterchromosomen am Ende der Replikation ist und das bakterielle Chromosom während der Replikation mit der Cytoplasmamembran verbunden ist (160), ist die Nähe von Topoisomerase IV zu den Tochterchromosomen für die anschließende Trennung (Decatenierung) notwendig (170). Darüber hinaus besitzt Topoisomerase IV weitere Aufgaben, wie die Trennung verbundener Intermediate, die während der Rekombination auftreten (420), oder die Relaxierung positiver Precatenane (Vorstufen verknüpfter Chromosomen), die hinter der Replikationsgabel entstehen (69). Ebenfalls konnte eine Beteiligung von Topoisomerase IV bei der Relaxierung negativer Superhelices bestätigt werden (373). Das Enzym unterstützt somit Topoisomerase I bei der Auflösung von Torsionsspannungen. Sowohl Topoisomerase IV als auch Gyrase sind essentiell für die bakterielle Zelle. Bakterien mit Defektmutationen in Gyrase und Topoisomerase IV sind nicht lebensfähig (101, 171, 190, 215, 271, 330, 419).

Die Reaktionsmechanismen von Gyrase und Topoisomerase IV verlaufen vermutlich in ähnlicher Weise ab. Zu Beginn eines Reaktionszyklus von Gyrase (**Abbildung 1.6A**) wird ein 140 bp großer DNA-Abschnitt in einer positiven Superspirale um das Enzym gewickelt (167, 183, 304, 392). Nur ca. 40 bis 50 bp der DNA – bezeichnet als G-

Segment – werden direkt von den Untereinheiten bedeckt und interagieren mit der Cleavage-Domäne von GyrA (Helix-turn-Helix Bindemotiv) (55, 291, 303). Die beiden GyrB-Untereinheiten bilden in diesem Komplex das offene „N-Gate“, die GyrA-Untereinheiten das geschlossene „C-Gate“. Bis sich ein weiteres DNA-Segment – bezeichnet als T-Segment – desselben oder eines entfernteren DNA-Moleküls im N-Gate befindet, vollziehen die GyrB-Untereinheiten einen Kreislauf des Öffnens und Schließens dieses N-Gates (55). Sobald die Bindung von ATP an die ATPase-Domänen der GyrB-Untereinheiten erfolgt ist und sich ein T-Segment im N-Gate befindet, schließt sich dieses Gate. Die Bindung von ATP bewirkt somit eine Konformationsänderung des Enzyms, in Folge derer die GyrA-Untereinheiten einen um 4 bp versetzten Doppelstrangbruch in die DNA einführen (112, 357). Die 5'-Phosphatenden der DNA werden dabei jeweils an die phenolische OH-Gruppe von Tyrosin 122 in den beiden GyrA-Untereinheiten gebunden (144, 180). Die Hydrolyse eines ATP-Moleküls wird für den beschleunigten Transport des T-Segments durch das geöffnete G-Segment in das C-Gate verantwortlich gemacht (23, 168, 249, 250). Nachdem der Transport abgeschlossen ist, erfolgt die Religation des Doppelstrangbruchs. Die Religation wird als treibende Kraft bei der Öffnung des C-Gates und der Freisetzung des T-Segments angenommen (55). Die anschließende Hydrolyse des zweiten ATP-Moleküls und die Freisetzung der Hydrolyseprodukte versetzen das Enzym in den ursprünglichen Zustand bzw. in die Bereitschaft für einen weiteren Zyklus (55).

Der Unterschied zwischen den Reaktionszyklen von Gyrase und Topoisomerase IV beruht auf der Bindung der DNA zu Beginn eines Zyklus. Topoisomerase IV bindet vorzugsweise an Überkreuzungen unterschiedlicher DNA-Moleküle (DNA-Crossover) (**Abbildung 1.6B**). Eine Umwicklung der DNA um das Enzym wie bei Gyrase findet nicht statt (126, 289, 418).

Abbildung 1.6: Modellvorstellung des Reaktionsmechanismus von Gyrase und Topoisomerase IV (entwickelt aus Champoux, 2001 und Hawkey, 2003)



Im oberen Teil des Schemas (A) ist die Überspiralisierungsreaktion von Gyrase, im unteren Teil (B) die Trennung der Tochterchromosomen durch Topoisomerase IV dargestellt.

1.4 Wirkungsweise von Chinolonen

Topoisomerasen sind auf Grund ihrer Funktion essentiell für die bakterielle Zelle (s. 1.3) und stellen daher geeignete Zielstrukturen für eine antibakterielle Chemotherapie dar. Eine Hemmung der Topoisomerasen kann über eine Inhibition des Wachstums bis hin zum bakteriellen Zelltod führen. Obgleich erste Hemmstoffe für Topoisomerase I gefunden wurden (97), werden bisher nur Inhibitoren der Typ II-Topoisomerasen therapeutisch eingesetzt. Unter den Letzteren gibt es bisher eine geringe Anzahl an Substanzen, die die Bindung von ATP an die ATP-Bindungsdomäne von GyrB und ParE behindern. Dazu zählt Novobiocin – ein Aminocoumarinderivat –, welches jedoch auf Grund seines Einflusses auf eukaryontische Proteine und Zellstrukturen (Effekt auf eukaryontische Topoisomerase II, Bindung an Histone, Inhibition der DNA-Polymerase α und der mitochondrialen Aktivität) und der auftretenden Nebenwirkungen (z.B. Hepatotoxizität) geringe Anwendung findet (53, 90, 157, 209, 244). Eine neue Klasse potenter ATPase-Inhibitoren – die Aminobenzimidazole – wurde kürzlich beschrieben (121, 223). Diese Substanzen befinden sich zur Zeit jedoch noch in der präklinischen Testphase. Abgesehen von diesen Inhibitoren stellen die Typ II-Topoisomerasen Gyrase und Topoisomerase IV auch die bakteriellen Zielstrukturen für die Chinolone dar, die eine große Bedeutung in der Therapie von bakteriellen Infektionen haben (112, 115, 172, 237, 287, 357). Im Gegensatz zu Novobiocin oder den Aminobenzimidazolen interagieren Chinolone vorrangig mit der GyrA-Untereinheit von Gyrase bzw. der ParC-Untereinheit von Topoisomerase IV (303).

Chinolone besitzen einen bakteriziden Wirkungstyp und rufen den bakteriellen Zelltod schneller als andere bakterizide Antibiotika, wie z.B. die β -Laktame, hervor (108). Die Absterberate der Bakterien ist dabei jedoch nicht (wie bei den β -Laktamen) abhängig von der Einwirkungszeit der Chinolone, sondern von der eingesetzten Konzentration (381) und findet ein Maximum bei der optimalen bakteriziden Konzentration (252). Im Vergleich zu den β -Laktamen, die ausschließlich auf proliferierende Zellen bakterizid wirken (221), sind einige Fluorchinolone befähigt, Bakterien in unterschiedlichen physiologischen Stadien abzutöten. Vier bakterizide Mechanismen sind bekannt (**Tabelle 1.1**). Alle Chinolone besitzen einen bakteriziden Effekt gegenüber sich teilenden Bakterien mit aktiver Proteinbiosynthese und zeigen somit Mechanismus A (201, 202, 346). Einige Fluorchinolone besitzen zusätzlich Mechanismus B, der sie dazu befähigt,

ruhende Zellen und Zellen mit einer inaktiven Proteinbiosynthese abzutöten (148, 347). Darüber hinaus sind Teilmechanismen von Mechanismus B bekannt. Fluorchinolone, die gegenüber ruhenden Zellen aktiv sind, aber eine aktive Proteinbiosynthese benötigen, besitzen Mechanismus C, hingegen weisen Fluorchinolone, die teilungsaktive Zellen, jedoch keine aktive Proteinbiosynthese benötigen, Mechanismus B₁ auf (251, 253).

Table 1.1: Bakterizide Mechanismen von Chinolonen

Mechanismus	Effekt auf	
	teilungsinaktive Zellen	Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese
A	–	–
B	+	+
B₁	–	+
C	+	–

+ = Effekt vorhanden, – = Effekt nicht vorhanden

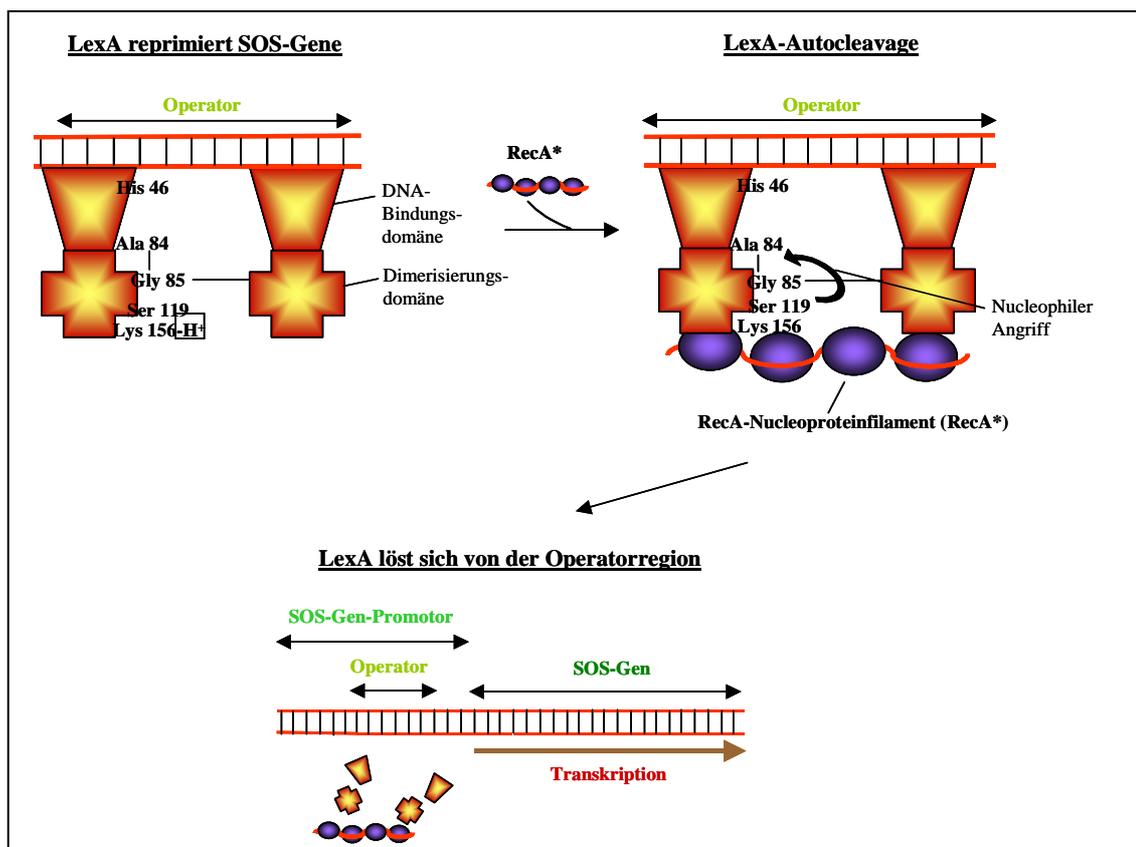
Ungeachtet des bakteriziden Wirkungstyps ist das zentrale Ereignis der Chinolonwirkung, die Stabilisierung von Gyrase- bzw. Topoisomerase IV-DNA-Komplexen, für alle beschriebenen Chinolone gleich. Während des Katalysezyklus der Typ II-Topoisomerasen besteht eine Gleichgewichtsreaktion zwischen der Einführung (Cleavage) und dem Schließen (Religation) eines Doppelstrangbruchs (272, 311, 397). In ternären Komplexen aus Chinolon, Enzym und DNA, die auch als spaltbare Komplexe oder Cleavage-Komplexe bezeichnet werden, wird das Gleichgewicht in Richtung der Cleavage-Reaktion verschoben und darüber hinaus eine Religation der DNA verhindert, so dass doppelsträngige Läsionen in der DNA entstehen (14). Die genaue Interaktion der Chinolone mit dem Enzym-DNA-Komplex ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch verschiedene Modellvorstellungen. Shen und Kollegen postulieren das Modell der „Kooperativen-Chinolon-Bindung“. Danach binden vier oder mehr Chinolonmoleküle in einer DNA-Einzelstrangblase an die DNA. Hierbei spielt die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wasserstoff-Donoren in der DNA und den Carbonyl- und Carboxylgruppen der Substanzmoleküle nahe der DNA-Cleavage-Site im Enzym-DNA-Komplex eine Rolle. Die Interaktion der Chinolone mit dem Enzym erfolgt durch den C7-Substituenten (193, 341). Das „positional poison model“ setzt voraus, dass nur ein einziges Chinolonmolekül in der Lage ist, die DNA in der Nähe der

Schnittstelle zu deformieren und diese somit ein bevorzugtes Cleavage-Substrat für das Enzym darstellt (179, 225). Neuere Untersuchungen weisen auf eine Verknüpfung dieser beiden Modelle hin (195). Leo und Kollegen postulieren ein Modell, in dem zwei Chinolone in Anwesenheit von Mg^{2+} an einzelsträngige DNA in einer DNA-Blase binden. Die Bindung erfolgt durch die Ausbildung einer Mg^{2+} -Brücke zwischen den Carbonyl- und Carboxylgruppen der Chinolone und den DNA-Einzelsträngen und führt zu einer Deformation der DNA. Die Wechselwirkung zwischen Chinolon und Enzym bezieht das im neutralen Milieu protonierte Amin des C7-Substituenten mit ein (195).

Die Bildung ternärer Komplexe führt zur Inhibierung wichtiger Abläufe in der bakteriellen Zelle. So stellt ein ternärer Komplex mit Gyrase ein Hindernis für das Fortschreiten der Replikationsgabel oder der RNA-Polymerase dar (407). Die Bildung ternärer Komplexe mit Topoisomerase IV – beim Versuch des Enzyms die Tochterchromosomen zu trennen – blockiert die Replikationsgabel am Ende der Replikation (338). Die Kollision des Komplexes mit der Replikationsgabel oder der RNA-Polymerase ist für den bakteriziden Effekt der Chinolone notwendig. Es entstehen somit irreversible ternäre Komplexe bzw. Doppelstrangbrüche (88). Die Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen stellt das zentrale Event der Chinolonwirkung dar, führt jedoch nicht unmittelbar zum Zelltod. Auf Grund der Doppelstrang-Läsion wird ein DNA-Reparatur-System – das SOS-Regulon – induziert (122, 236, 292, 293). Das SOS-Regulon umfasst über 30 Gene, die an verschiedenen Prozessen wie der DNA-Reparatur, der -Rekombination der -Mutagenese und der Hemmung der Zellteilung beteiligt sind (62, 139, 385). An der Induktion der SOS-Antwort sind zunächst drei Proteine beteiligt: RecA, RecBCD und LexA. Das Genprodukt von *lexA* ist ein monomeres Protein. Zwei Monomere (Dimer) bilden den funktionstüchtigen LexA-Repressor des SOS-Regulons (178). Dieser bindet an spezifische Sequenzen in der Operatorregion (SOS-Box) SOS-induzierbarer Promotoren (47, 48, 107, 204, 324, 385). Die Induktion der SOS-Gene setzt somit die Inaktivierung von LexA voraus (162), wozu verschiedene Schritte notwendig sind. Der RecBCD-Enzymkomplex spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Doppelstrangbrüchen in der DNA (57, 188). Dieser Multienzymkomplex (365) baut beginnend am Doppelstrangbruch ein Stück eines DNA-Stranges (von 3'- in 5'-Richtung) ab, so dass ein einzelsträngiges, ungepaartes DNA-Segment entsteht (13, 364). Letzteres stellt das Induktionssignal für das zentrale SOS-Regulatorprotein RecA dar, welches auch in

ungeschädigten Zellen in geringer Anzahl vorliegt (328). An die Einzelstrangregion bindet zunächst ein RecA-Monomer. Dieser Bindung folgt die kooperative Bindung weiterer RecA-Monomere, was in der Bildung eines RecA-Nucleoproteinfilamentes resultiert (214). Die Filamentform konvertiert RecA in eine aktivierte Form – RecA* –, welche eine Coproteasefunktion aufweist. Diese ist notwendig für die Stimulierung der Selbstspaltung (Autocleavage) des LexA-Repressors (86, 208, 345). Die Bindung von RecA* an LexA löst die Deprotonierung eines Lysinrestes in der jeweiligen Dimerisierungsdomäne einer Untereinheit des dimeren Repressorproteins aus. Dies erlaubt die Aktivierung von Serinresten in den Dimerisierungsdomänen und jeweils die Stimulierung eines nucleophilen Angriffs (*Abbildung 1.7*) auf die Peptidbindung der Aminosäuren Alanin 84 und Glycin 85 (208, 344, 386).

Abbildung 1.7: Induktion der SOS-Gene durch RecA*-abhängige Selbstspaltung des LexA-Repressors (erstellt aus Little, 1993 und Walker, 1996)



Die obere Darstellung stellt schematisch die Repression der SOS-Gene durch den LexA-Repressor (orange-gelbe Symbole) und die von RecA* (aktivierte Form von RecA) abhängige Selbstspaltung des Repressors dar. Der somit inaktivierte LexA-Repressor löst sich von der Operatorregion der SOS-induzierbaren Promotoren, in Folge dessen die Transkription der SOS-Gene erfolgen kann.

Diese Aminosäuren befinden sich in verschiedenen Domänen je einer Untereinheit des Repressors. Durch die Auflösung der Peptidbindungen kommt es zur Spaltung in den Untereinheiten und zur Auflösung der dimeren Struktur. Die Spaltung des LexA-Repressors führt zur Induktion der SOS-Gene (208). Die Induktion betrifft auch das *recA*-Gen selbst, wodurch die Anzahl der RecA-Proteinmoleküle in der Zelle von ca. 7.200 auf ca. 180.000 ansteigt (328). Der Grad der Induktion, d.h. die Anzahl der induzierten SOS-Gene, hängt mit dem Ausmaß der DNA-Schädigung zusammen (386). Die Gruppe um Lewis zeigte darüber hinaus, dass die Induktion eines SOS-Gens von der Stärke der Bindung des LexA-Repressors an die SOS-Box des Gens abhängig ist. Bei einer geringen DNA-Schädigung werden somit nur Gene exprimiert, an deren SOS-Box LexA schwach bindet (204, 331).

Im Normalfall sinkt die Konzentration des aktivierten RecA* nach der Reparatur der DNA-Schäden, woraufhin LexA seine Funktion als Repressor der SOS-Gene wieder übernimmt (147, 386). Durch die Behandlung von Bakterienzellen mit Chinolonen wird die DNA dagegen dauerhaft geschädigt (137, 149). Dies resultiert in einer konstitutiven Induktion des SOS-Systems, einer fortschreitenden Mutagenisierung des Genoms (durch mutagene SOS-Reparaturmechanismen) und der Bildung von Autolysinen, welche letztendlich zum Tod der Bakterienzelle führen (147, 385). Neben ihrer Wirkung auf die bakterielle Zelle besitzt die Mehrzahl der Chinolone auch einen geringen Effekt gegenüber eukaryontischen Typ II-Topoisomerasen (28, 92, 244, 309). Als Ursache dafür wird die strukturelle und funktionelle Homologie der pro- und eukaryontischen Typ II-Topoisomerasen angesehen (146). Für eine Hemmung der eukaryontischen Enzyme sind jedoch 100- bis 10.000-fach höhere Konzentrationen notwendig (273). Schädigungen der eukaryontischen Zellen durch Chinolone, die in der antibakteriellen Therapie eingesetzt werden, können somit weitgehend ausgeschlossen werden (151). Während der Entwicklung neuer Chinolone wurden jedoch auch Chinolonderivate (z.B. CP-115,953, A-65281, A-65282) gefunden, die eukaryontische Typ II-Topoisomerasen effizient hemmen können (187, 309). Diese Derivate stehen bei einer antibakteriellen Therapie nicht zur Diskussion. Sie können jedoch hilfreich bei der Entwicklung neuer Substanzen für die Krebs-Therapie sein (309), da bei dieser eine Schädigung der eukaryontische Typ II-Topoisomerasen in stark proliferierenden Zellen (Tumoren) beabsichtigt ist.

1.5 Bakterielle Resistenzmechanismen gegenüber Chinolonen

Obwohl höhere Pilze zum Abbau von Chinolonen befähigt sind, wurden bisher keine bakteriellen Enzyme, die zur Inaktivierung von Chinolonen führen, entdeckt (228, 403, 404). Die bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen beruht auf zwei anderen Resistenzmechanismen, zum einen auf Veränderungen in den Zielstrukturen (Gyrase und Topoisomerase IV), zum anderen auf einer verringerten Akkumulation der Substanzen in der Zelle (115, 130, 131).

Mutationen in Gyrase und Topoisomerase IV wurden in spezifischen Regionen (QRDR) der Gyrasegene *gyrA* und *gyrB* bzw. der Topoisomerase IV-Gene *parC* und *parE* (entsprechen *grlA* und *grlB* in *S. aureus*) gefunden – vermehrt in *gyrA* und *parC* (*grlA*), in geringerem Maße in *gyrB* und *parE* (*grlB*) – und führen wahrscheinlich zu einer verringerten Affinität der Chinolone zu den Zielenzymen (76, 94, 98, 133, 134, 142, 362, 416). Häufig von einem Aminosäureaustausch betroffen sind die Positionen 83 und 87 in *gyrA* und 80 und 84 in *parC* (164, 270, 363, 376, 378, 415). Für die Ausbildung einer klinisch bedeutsamen Resistenz gegenüber älteren Chinolonen wie Nalidixinsäure reicht oft eine Mutation aus. Hingegen ist für eine Resistenz gegenüber Fluorchinolonen eine Kombination aus mehreren Einzelmutationen notwendig (129, 132, 320, 377). Mutationen in *gyrB* und *parE* können ebenfalls – wenn auch in geringem Maße – zu einer verminderten Sensibilität führen, was darauf hinweist, dass an den Wechselwirkungen zwischen Chinolonen und Zielstrukturen nicht nur die Untereinheiten GyrA und ParC beteiligt sind (413). Ein weiterer Resistenzmechanismus, der in Zusammenhang mit Mutationen in den Zielstrukturen zur Ausbildung klinischer Resistenz führt, beruht auf einem gesteigerten Austransport (Efflux) der Chinolone aus der Zelle und somit auf der Verringerung der Chinolonkonzentration an ihrem Wirkungsort. Verantwortlich für den erhöhten Efflux sind Mutationen in regulatorischen Elementen verschiedener Effluxsysteme (30, 175, 265, 414). In *E. coli* beispielsweise führen Mutationen in *marR*, einem Repressorprotein des *marRAB*-Operons, zu einer gesteigerten Expression des Transkriptionsaktivators MarA, der die Überexpression verschiedener Gene bewirkt (9). Darunter befinden sich auch die Gene des AcrAB-Effluxpumpensystems in *E. coli* (241, 268). Die erhöhte Expression dieser Gene resultiert in einem verstärkten Efflux der Chinolone aus der Zelle. MarA führt zudem durch die Aktivierung eines negativen Regulators der Porinsynthese – der Antisense RNA *micF* – zu einer verringerten Bildung ver-

schiedener Porine (60, 131). Diese wassergefüllten Kanäle in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien sind für den Eintritt verschiedener Chinolonmoleküle in die Zelle notwendig. Eine verringerte Anzahl, insbesondere des Hauptporins OmpF, steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Resistenz gegenüber hydrophilen Chinolonen (16, 67, 140).

Veränderungen der Zielstrukturen, gesteigerter Efflux und die Verringerung von Porinen werden chromosomal vermittelt und galten lange Zeit als einzige Resistenzmechanismen gegenüber Chinolonen. Inzwischen gibt es Berichte über Plasmid-vermittelte Chinolonresistenz (233) und deren Übertragung durch Konjugation (395). Die Plasmide tragen das Gen *qnr*, welches für ein 218 Aminosäuren umfassendes Protein – Qnr – codiert (367) und Gyrase vor einer Inhibition durch Chinolone schützt (367, 368). Der genaue Mechanismus der Gyrase-Protektion ist nicht geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass Qnr gebunden an Gyrase die Bindungsfähigkeit von Gyrase an die DNA und somit die Anzahl der Gyrase-DNA-Komplexe für die Inhibition durch Chinolone herabsetzt (368). Für eine Interaktion von Qnr und Topoisomerase IV gibt es bislang keine Hinweise (367). Qnr-vermittelte Resistenz bedingt nur eine geringe Veränderung der Sensibilität. Die Ausbildung einer klinischen Resistenz im Zusammenhang mit Mutationen in den Zielstrukturen oder einer herabgesetzten Akkumulation von Chinolonmolekülen in der Zelle ist jedoch denkbar. Die Ausbreitung dieses Plasmid-vermittelten Resistenzmechanismus ist daher als problematisch anzusehen. Beschränkte sich das Auftreten von *qnr*-Resistenzplasmid-tragenden Stämmen bisher nur auf die USA und China, so gibt es zunehmend auch Berichte über *qnr*-positive Stämme in Europa (163, 219).

1.6 Gründe und Lösungsansätze für das Chinolonresistenz-Problem

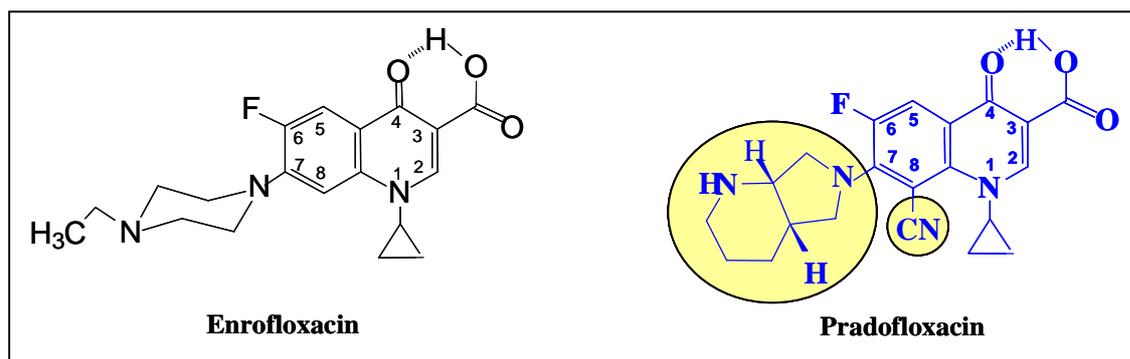
Chinolone – insbesondere Fluorchinolone – wurden in den letzten Jahrzehnten vermehrt zur Behandlung vieler bakterieller Infektionen, wie Gonorrhoe, Osteomyelitis, Urogenitaltrakt-, enterische und respiratorische Infektionen, eingesetzt (5, 74, 379). Darüber hinaus wurden Chinolone auch in der Veterinärmedizin extensiv genutzt, entweder zu Behandlungszwecken oder als Futteradditive (5). Der Einsatz dieser Antibiotika als präventive Maßnahme zur Infektionsvermeidung bei Mensch (118) und Tier (337) spielt eine weitere entscheidende Rolle bei der Resistenzentwicklung. Auch der zum Teil un-

sachgerechte Gebrauch dieser Antibiotika durch Ärzte, Patienten oder Tierhalter kann für die rasche Entwicklung einer bakteriellen Resistenz verantwortlich gemacht werden (100, 206, 229). Ebenfalls zur Resistenzsituation beigetragen hat der Einsatz von älteren Chinolonen mit geringer Aktivität in einigen Entwicklungsländern (124). Für die Lösung des Resistenzproblems stehen mehrere Optionen zur Verfügung. Dazu zählen der sachgerechte Umgang mit Chinolonen in der antibakteriellen Therapie, das Verbot des Einsatzes von Chinolonen als Futteradditive und die Vermeidung von Analogpräparaten in der Human- und Veterinärmedizin (131, 206, 308). Eine besondere Stellung in Bezug auf eine Vermeidung bzw. verlangsamte Resistenzentwicklung nimmt die Suche nach neuen Chinolonen ein. Bei der Entwicklung neuer, potenter Chinolone stehen dabei mehrere Eigenschaften im Vordergrund: die gleichzeitige Hemmung von Gyrase und Topoisomerase IV (dual-targeting), eine verminderte Fähigkeit zur Selektion resistenter Bakterien, die Wirkung auf Erreger in unterschiedlichen physiologischen Stadien und die Wirkung auf bereits resistente Bakterien (213, 426).

1.7 Pradofloxacin – ein neues C8-Cyanofluorchinolon

Pradofloxacin ist ein von der Firma Bayer neu entwickeltes Fluorchinolon. Es wurde für die Behandlung bakterieller Infektionen im veterinärmedizinischen Bereich entwickelt. Der Struktur von Pradofloxacin liegt ein Chinolingerüst zu Grunde. Die Grundsubstitutionen der Positionen C3 (Carbonsäuregruppe), C4 (Oxogruppe), N1 (Cyclopropyl) und C6 (Fluoratom) sind vergleichbar mit anderen Fluorchinolonen, wie z.B. Enrofloxacin, einem in der Veterinärmedizin bereits eingesetzten Fluorchinolon. Im Vergleich zur Struktur von Enrofloxacin gibt es zwei wichtige Abweichungen: der Ethylpiperazinring an C7 wurde durch einen Pyrrolidinopiperidinring ersetzt und an C8 eine Cyanogruppe eingeführt (*Abbildung 1.8*). Mit der Einführung einer Azabicyclogruppe wie Pyrrolidinopiperidin ist eine gesteigerte Wirkung auf grampositive Bakterien sowie eine Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften zu erwarten (25). Durch die C8-Cyanogruppe soll das Potential zur Selektion resistenter Bakterien gesenkt und die bakterizide Aktivität gegenüber bereits resistenten Bakterien gesteigert werden. Beide Thesen konnten für frühere Fluorchinolone mit C8-Substituenten bestätigt werden (85, 213, 256).

Abbildung 1.8: Strukturunterschiede zwischen Enro- und Pradofloxacin



1.8 Ziel der Arbeit

Der Vergleich der antibakteriellen Wirkung neuer Chinolone mit Hilfe von herkömmlichen Methoden, wie der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration, weist in der Regel nur geringfügige Unterschiede zwischen den zumeist hochaktiven Substanzen auf. Für eine exakte Einteilung der Chinolone nach ihrer Wirksamkeit ist die Entwicklung neuer, empfindlicherer Detektionsmethoden notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der biologischen Aktivität von Pradofloxacin und die Ermittlung des Einflusses der neuen C8-Cyanogruppe auf die antibakterielle Wirkung dieser Substanz im Vergleich zu anderen Fluorchinolonen mit und ohne C8-Substitution mit Hilfe von herkömmlichen und neuentwickelten zellulären und molekularbiologischen Testsystemen.

Ein erster Eindruck über die Wirksamkeit von Pradofloxacin auf verschiedene Wildtyp- und Mutantenstämme sollte durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration gewonnen werden.

Neben der Wirkung auf bereits resistente Bakterien sollte das Potential eines neuen Chinolons zur Selektion resistenter Bakterien möglichst gering sein. Eine Hemmung beider Zielstrukturen – Gyrase und Topoisomerase IV – erscheint dabei von Vorteil zu sein. In Selektionsversuchen mit verschiedenen Bakterienspecies sollte daher das Potential zur Selektion resistenter Bakterien sowie die bevorzugte Zielstruktur von Pradofloxacin ermittelt werden.

Fluorchinolone unterscheiden sich darüber hinaus durch ihre Fähigkeit Bakterien in unterschiedlichen physiologischen Stadien abzutöten. Die Bestimmung des Wirkungstyps

und der Anzahl der bakteriziden Mechanismen von Pradofloxacin mit Hilfe von Absterbekinetiken in verschiedenen Medien stellte daher ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit dar.

Unabhängig von der Anzahl verschiedener bakterizider Mechanismen beruht der bakterizide Effekt von Chinolonen stets auf mehreren im Zellinneren stattfindenden molekularen Ereignissen. In diesem Zusammenhang wurden in dieser Arbeit erstmals zwei für die antibakterielle Wirkung von Fluorchinolonen grundlegende, molekulare Mechanismen – die Generierung von Typ II-Topoisomerase-assoziierten-DNA-Doppelstrangbrüchen und die Induktion der SOS-Antwort – in einer Studie untersucht. Durch die Etablierung von In-vitro-Testsystemen (Cleavage-Assays) mit isolierten Zielenzymen sollte die Quantifizierung der Aktivität von Pradofloxacin auf Gyrase und Topoisomerase IV ermöglicht bzw. die minimale Konzentration von Pradofloxacin zur Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen bestimmt werden. Darüber hinaus sollte das Ausmaß der SOS-Induktion – die letztendlich den bakteriellen Zelltod einleitet – durch ein neu entwickeltes In-vivo-Testsystem (Reporterassay), bestehend aus dem Promotor eines SOS-Gens und dem Luciferasegen aus *Photinus pyralis*, quantifiziert werden.

Einen wichtigen Aspekt bei der Charakterisierung eines neuen Fluorchinolons stellt auch die Bestimmung der Aktivität der Substanz gegenüber eukaryontischen Typ II-Topoisomerasen dar. Eine Hemmung von pro- und eukaryontischen Typ II-Topoisomerasen in gleichem Maße könnte während einer Therapie mit Chinolonen zu Nebenwirkungen führen. Da mit Hilfe von Cleavage-Assays das gleiche molekulare Ereignis der Chinolonwirkung (Generierung eines DNA-Doppelstrangbruches) gemessen werden kann, ist ein direkter Vergleich der Aktivität von Chinolonen gegenüber pro- und eukaryontischen Enzymen möglich. In diesem Zusammenhang sollte die Etablierung eines Cleavage-Assays mit humaner Topoisomerase II zur Quantifizierung der Aktivität von Pradofloxacin auf eukaryontische Typ II-Topoisomerasen dienen. Durch den Vergleich der Aktivität von Pradofloxacin auf humane Topoisomerase II mit der Aktivität auf bakterielle Gyrase sollten Rückschlüsse auf die Enzymselektivität der Substanz gezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in den **Tabellen 2.1** und **2.2** aufgeführt. Die Tabellen enthalten weiterhin Hinweise auf die genetischen Marker und die Herkunft der Stämme.

Tabelle 2.1: *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft / Referenz
WT	-----	Heisig & Tschorny, 1994
WT-2	<i>gyrA</i> S83L	Laborisolat
WT-4	<i>parC</i> S80I	Bagel et al., 1999
WT-3-1	<i>gyrA</i> S83L + D87G	Bagel et al., 1999
WT-K	<i>gyrB</i> S464Y	diese Arbeit
MII-M19	<i>gyrA</i> S83L / <i>marR</i> Δ 175	Laborisolat
MIII-300/16	<i>gyrA</i> S83L + D87G / <i>parC</i> S80I <i>marR</i> Δ 74	Schulte, 2001
4971-M-C1	<i>gyrA</i> S83W + D87Y / <i>parC</i> G78D <i>marO</i> ::IS / Δ <i>acrR</i>	Laborisolat
JM83	<i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL thi-1 _80</i> Δ <i>lacZ</i> Δ M15	Yanisch-Perron et al., 1985
JM109	F' (<i>traD</i> 36 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^a <i>lacZ</i> Δ M15) Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>glnV</i> 44 <i>e14-</i> <i>gyrA</i> 96 <i>recA1 relA1 endA1 thiA hsdR</i> 17 / pBR322	Yanisch-Perron et al., 1985
TOP10F'	F' { <i>lacIq TN10 (tet</i> ^R <i>)</i> } <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>recA1 deoR araD</i> 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL (Str</i> ^R <i>) endA1 nupG</i>	Invitrogen
ER1821	F' <i>glnV</i> 44 <i>e14</i> ' (<i>mcrA</i> ⁻) <i>rfbD</i> 1? <i>relA</i> 1? <i>endA1 spoT</i> 1? <i>thi-1</i> Δ (<i>mcr-mrr</i>) 114::IS10	New England BioLabs

Tabelle 2.2: Staphylokokken Stämme

Species	Stamm	Genotyp	Herkunft / Referenz
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	-----	H.-G. Wetzstein, Bayer HealthCare
	Q48.1.2-1	<i>grlA</i> E84K	H.-G. Wetzstein, Bayer HealthCare
	Q24.2.5-3	<i>grlA</i> E84K + <i>gyrA</i> S84L	H.-G. Wetzstein, Bayer HealthCare
<i>S. intermedius</i>	ATCC 29663	-----	H.-G. Wetzstein, Bayer HealthCare

2.1.2 Plasmide

Tabelle 2.3 zeigt die den Klonierungsexperimenten zugrundeliegenden Vektoren bzw. die erzeugten rekombinanten Plasmide unter Angabe der wichtigsten genetischen Elemente und ihrer Größe.

Tabelle 2.3: Vektoren und rekombinante Plasmide

Vektor	rekombinan- ter Vektor*	genetische Elemente	relevante(s) Gen bzw. Genfusion	Größe [bp]	Herkunft
pGem-luc	-----	<i>bla</i>	<i>luc</i>	4933	Promega
pCR.2.1-TOPO	-----	<i>lacZα</i> , <i>bla</i> , <i>aphA</i>	-----	3931	Invitrogen
	pPHB441	<i>bla</i> , <i>aphA</i>	<i>precA-luc</i>	5944	diese Arbeit
pBR322, relaxiert	-----	<i>bla</i> , <i>tet</i>	-----	4361	TopoGen
pBR322, supercoiled	-----	<i>bla</i> , <i>tet</i>	-----	4361	TopoGen
pBR322	-----	<i>bla</i> , <i>tet</i>	-----	4361	Bolivar et al., 1977
	pPHB340 (ehemals: pBR322- <i>luc</i>)	<i>tet</i>	<i>luc</i>	6067	Abu Mraheil, 1999
	pPHB341	<i>tet</i>	<i>precA-luc</i>	6362	diese Arbeit
	pPHB342	<i>tet</i>	<i>precA-luc</i>	6362	diese Arbeit

* Die Nomenklatur der rekombinanten Plasmide richtet sich nach folgenden Regeln:

PHB = Pharmazeutische Biologie, 1. Ziffer = verwendeter Vektor (4 = pCR2.1-TOPO, 3 = pBR322), 2. Ziffer = Projekt (4 = SOS-Induktion), 3. Ziffer (0, 1, 2 = Angaben über die Orientierung des Inserts im Vektor)

2.1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide (*Tabelle 2.4*) wurden zum einen mit dem DNA-Synthesizer, Modell 391 PCR-Mate, selbst hergestellt, zum anderen von der Firma Sigma bezogen. Die Klonierungs- bzw. SOEing-Primer wurden nach ihrer Synthese OPC bzw. HPLC gereinigt. Der jeweilige Verwendungszweck der Primer ist in der unteren Tabelle beschrieben.

Tabelle 2.4: Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge [bp]	Primersequenz*	Lokalisation relativ zum Gen	Funktion	Herkunft
LUC3-3	28	5'-GTGCTGCAGTGGAGGATTACAATAGCT-3' <i>Pst</i> I	nt +1704 bis +1685	Klonierungsprimer (<i>luc</i> Gen)	Abu Miraheil, 1999
LUC5-B-1	34	5'-CATGACAGGAGTAAAAATGGAAGACGCCAAAAAAC-3'	nt +1 bis +18	Klonierungsprimer (<i>luc</i> Gen), SOEing-Primer	diese Arbeit
RECA5-1	30	5'-AGGCTGCAGTGATTATGCCGTGCTATTA-3' <i>Pst</i> I	nt -290 bis -27	Klonierungsprimer (<i>recA</i> -Promotor)	diese Arbeit
RECA3-1	34	5'-GTTTTTGGCGTCTTCCATTTTACTCCTGTCATG-3'	nt +3 bis -16	Klonierungs- (<i>recA</i> -Promotor), SOEing-, Sequenzierungsprimer	diese Arbeit
LUC-O	23	5'-GGAGCACGGAAAGACGATGACGGG-3'	nt +1460 bis +1482	Sequenzierungsprimer	Abu Miraheil, 1999
LUC-O-2	23	5'-CCGTCATCGTCTTTCCCGTGCTCC-3'	nt +1482 bis +1460	Sequenzierungsprimer	diese Arbeit
LUC-M	23	5'-TCACTGCATACGACGATTCTGTG-3'	nt +247 bis +225	Sequenzierungsprimer	Abu Miraheil, 1999
LUC-M-2	23	5'-CACAGAAATCGTCGTATGCAGTGA-3'	nt +225 bis +247	Sequenzierungsprimer	diese Arbeit
LUC-I-1	21	5'-GATTCTCGCATGCCAGAGATC-3'	nt +652 bis +672	Sequenzierungsprimer	diese Arbeit
LUC-I-2	21	5'-GGTCACTGAGACTACATCAG-3'	nt +1021 bis +1041	Sequenzierungsprimer	diese Arbeit

* Die gestrichelte Linie kennzeichnet den zur jeweiligen Gen-Sequenz komplementären Teil des Primers, der zur Berechnung der Annealingtemperatur herangezogen wurde, nt = Nukleotide

Fortsetzung **Tabelle 2.4:** Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge [bp]	Primersequenz	Lokalisation relativ zum Gen	Funktion	Herkunft
GYRA-3-1	25	5'-GGAATTTTGGTTGGCATGACGTCCG-3'	nt +491 bis +467	Sequenzierungsprimer	modifiziert nach Heisig et al., 1993
GYRA-5-1-1	26	5'-GAAATCCGGGATACAGTAGAGGGATAG-3'	Nt -33 bis -8	Sequenzierungsprimer	modifiziert nach Heisig et al., 1993
GYRB-5B9	19	5'-CGTACGCTGAACGCCCTACA-3'	nt +871 bis +889	Sequenzierungsprimer	Kratz, 1998
GYRB-3B2	17	5'-CCGTCGACGTCCGCATC-3'	nt +1260 bis +1242	Sequenzierungsprimer	Adachi et al., 1987
PARC-5-1	21	5'-GCCGAATAAGTTGAGGAATCAG-3'	nt -26 bis -6	Sequenzierungsprimer	Heisig, 1996
PARC-3-1	21	5'-AGCTCGGAAATATTTGACAAAC-3'	nt +392 bis +372	Sequenzierungsprimer	Heisig, 1996
GYRA-5'-S39V	20	5'-ACCAGTGAAAATGCGTGAATC-3'	nt +43 bis +62	Sequenzierungsprimer	Mayer, 2002
GYRA-3'-S357R	17	5'-GCTTCAGTATAACGCAT-3'	nt +377 bis +361	Sequenzierungsprimer	Mayer, 2002
GRL-3'	19	5'-TTAGGAAATCTTGATGGCA-3'	nt +485 bis +467	Sequenzierungsprimer	Mayer, 2002
GRL-5'	21	5'-ACTTGAAGATGTTTTAGGTGA-3'	nt +27 bis +48	Sequenzierungsprimer	Mayer, 2002

nt = Nukleotide

2.1.4 Antibiotika

In *Tabelle 2.5* sind die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika unter Angabe der Chargen-Nr. und Bezugsquelle aufgelistet. Die Antibiotika wurden nach Vorschrift des Herstellers gelöst und anschließend steril filtriert.

Tabelle 2.5: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Chargen-Nr.	Verwendung	Bezugsquelle
Pradofloxacin	HMT4273-99	Absterbekinetiken, MSIC-Bestimmung	Bayer HealthCare
	0048Z	Cleavage Assay	Bayer HealthCare
Enrofloxacin-HCl	PSM 3106/1	Absterbekinetiken, MSIC-Bestimmung	Bayer HealthCare
	R-177-4	Cleavage Assay	Bayer HealthCare
Enrofloxacin N-4'-oxid	k.A.	MSIC-Bestimmung	Bayer HealthCare
Marbofloxacin	280495	Absterbekinetiken, MSIC-Bestimmung, Cleavage Assay	Bayer HealthCare
Danofloxacin	HLR3158-16-1	Cleavage Assay	Bayer HealthCare
Orbifloxacin-HCl	HLR4905-2-1	Cleavage Assay	Bayer HealthCare
Ciprofloxacin-HCl	521635D/2/2	Absterbekinetiken, MSIC-Bestimmung, Cleavage Assay	Bayer HealthCare
Moxifloxacin	502714	Absterbekinetiken, MSIC-Bestimmung, Cleavage Assay	Bayer HealthCare
Bay Y3118	513257	Absterbekinetiken	Bayer HealthCare
Garenoxacin	DL116S	Cleavage Assay	Bristol-Meyers- Squibb
Gemifloxacin-Mesylat	BN3	Cleavage Assay	GlaxoSmithKline
Kanamycin-Monosulfat	121K1109	Selektion	Sigma
Ampicillin	063K0522	Selektion	Sigma
Tetracyclin	110K1491	Selektion	Sigma
Gentamicin-Sulfat	030K0680	Selektion	Sigma
Chloramphenicol	110K1606	Absterbekinetiken	Sigma

k.A. = keine Angabe

2.1.5 Nährmedien

Die eingesetzten Nährmedien zur Anzucht von Bakterien sind in **Tabelle 2.6** aufgelistet. Die Nährmedien wurden unmittelbar nach der Einwaage gelöst und autoklaviert.

Tabelle 2.6: Nährmedien

Medium	Bezugsquelle / Herstellung
Chinablau-Lactose-Agar	Oxoid, Basingstoke, England
LB-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar; pH 7,4; mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
LB-Bouillon	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl; pH 7,4; mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Standard NI-Nährbouillon	Merck (VWR), Hamburg
Mueller-Hinton-Bouillon	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA

2.1.6 Chemikalien

Die in den vorliegenden Versuchen verwendeten Chemikalien sind in **Tabelle 2.7** aufgeführt. Wenn nicht anders angegeben wurden die Substanzen in der Qualität „p.A.“ oder „reinst“ verwendet.

Tabelle 2.7: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar, granuliert	Merck (VWR), Hamburg
Agarose, Seakem [®] LE, für die Elektrophorese	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniak 30-33%, für die DNA-Synthese	Roth, Karlsruhe
Bacto Trypton	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Borsäure	Merck (VWR), Hamburg
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -galactosid	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau, für die Elektrophorese	BioRad, München
Calciumchlorid-dihydrat	Merck (VWR), Hamburg
Desoxynukleosidtriphosphat, 100 mM Lithium-Salz-Lösungen, für die PCR	Roche, Mannheim

Fortsetzung **Tabelle 2.7**: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Dimethylsulfoxid	Merck (VWR), Hamburg
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (VWR), Hamburg
Dithiothreitol, für die Elektrophorese	BioRad, München
Essigsäure, 100%	Acros, Geel, Belgien
Ethanol, absolut	Merck (VWR), Hamburg
Ethidiumbromid, 1%ige Lösung in H ₂ O	Merck (VWR), Hamburg
Ethylendiamin-tetra-acetat (Titriplex III)	Merck (VWR), Hamburg
Ficoll-400, 20%	Sigma, Taufkirchen
Glucose-monohydrat, für biochemische Zwecke	Merck (VWR) Hamburg
Glycerin, 87%	Merck (VWR) Hamburg
Glycerin, 99%	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt, granuliert, für die Mikrobiologie	Merck (VWR) Hamburg
Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Merck (VWR), Hamburg
Kaliumchlorid	Merck (VWR), Hamburg
Kalium-dihydrogenphosphat	Merck (VWR), Hamburg
Kaliumhydroxid	Merck (VWR) Hamburg
LiChrosolv-H ₂ O, für die Chromatographie	Merck (VWR) Hamburg
Mineralöl	BioRad, München
Natriumchlorid	Merck (VWR), Hamburg
Natriumdodecylsulfat, 10%	BioRad, München
Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid	Sigma, Taufkirchen
Reserpin	Giulini-Pharma
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
Safranin-O, für die Mikrobiologie	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37%	Merck (VWR) Hamburg
Smart Ladder (DNA-Längenstandard)	Eurogentec, Köln
trans-1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N',Tetraacetat	Sigma, Taufkirchen
Triethylamin	Sigma, Taufkirchen
Trifluoressigsäure	Merck (VWR), Hamburg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck (VWR), Hamburg
Xylencyanol	Merck (VWR), Hamburg

2.1.7 Enzyme

Tabelle 2.8 enthält die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme unter Angabe der Bezugsquelle.

Tabelle 2.8: Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche, Mannheim
Expand™ High Fidelity Polymerase	Roche, Mannheim
Gyrase	TopoGen, Columbus, Ohio, USA
Humane Topoisomerase II (p170 Form)	TopoGen, Columbus, Ohio, USA
Lysostaphin	Sigma, Taufkirchen
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Roche, Mannheim
<u>Restriktionsendonukleasen</u>	
<i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i> <i>PstI</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega, Madison, Wisconsin, USA
T4-Ligase (Rapid-Ligation-Kit)	Roche, Mannheim
Topoisomerase IV	TopoGen, Columbus, Ohio, USA

2.1.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.9 gibt die Zusammensetzung bzw. Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen an.

Tabelle 2.9: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
Acetonitril, 20%	Für 5 ml: 1 ml Acetonitril + 4 ml H ₂ O
Ammoniumhydroxid, 3%	Für 20 ml: 0,6 ml Ammoniumhydroxid + 19,4ml H ₂ O
<u>Cleavage-Assay</u>	TopoGen, Columbus, Ohio, USA
Gyrase Inkubationspuffer (5x)	175 mM Tris-HCL (pH 7,5), 120 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 9 mM Spermidin, 5 mM ATP, 32,5% Glycerol, 0,5 mg/ml BSA
Human Topo II Cleavage-Puffer (10x)	300 mM Tris-HCL (pH 7,6), 0,6 M NaCl, 80 mM MgCl ₂ , 30 mM ATP, 150 mM Mercaptoethanol
Topo IV Cleavage-Puffer (10x)	500 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 20 mM MgOAc, 100 mM DDT, 200 mM KCl, 10 mM Spermidin-HCL, 20 mM ATP, 1 mg/ml BSA
Proteinase K Puffer (5x)	50 mM Tris-HCL (pH 7,9), 1 mM CaCl ₂
<u>Luciferase-Assay-System</u>	
K ₂ HPO ₄ / EDTA-Puffer	1 M K ₂ HPO ₄ (pH 7,8), 20mM EDTA
Luciferase-Assay-Reagent	ohne Konzentrationsangaben, enthält Luciferin, ATP und Mg ²⁺
Cell Culture Lysis Reagent (5x)	125 mM Trisphosphat (pH 7,8), 10 mM DDT, 10 mM CDTA, 50% Glycerol, 5% Triton X-100
Lysis Mix	100 µl Lysozym [5 mg/ml], 200 µl CCLR [2x] + BSA [5 mg/ml],
Isotonische Kochsalzlösung, 0,9%	9 g NaCl mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren
MgCl ₂ -freier Puffer für Taq-Polymerase	Promega, Madison, Wisconsin, USA
MgCl ₂ -freier Puffer für Expand™ High Fidelity Polymerase	Roche, Mannheim
<u>PCR Purification Kit</u>	Qiagen, Hilden
QIAquick spin columns	
Puffer PB (Bindungspuffer)	ohne Angaben
Puffer PE (Waschpuffer)	ohne Angaben
Puffer EB (Elutionspuffer)	10 mM Tris-HCL, pH 8,5
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ in 800 ml H ₂ O lösen, mit HCl auf pH 7,4 einstellen, mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Fortsetzung **Tabelle 2.9**: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
<u>Plasmid Mini- / Midipräparations Kit</u>	Qiagen, Hilden
Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM TrisHCl (pH 8), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA
Puffer P2 (Lysispuffer)	200 mM NaOH, 1% SDS
Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
<u>zusätzlich in Midipräparations Kit</u>	
QIAGEN-tip 100	750 mM NaCl, 50 mM MOPS (pH 7,0), 15% Iso- propanol, 0,15% Triton®-X 100
Puffer QBT (Equilibrierungspuffer)	1 M NaCl, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% Isopro- panol
Puffer QC (Waschpuffer)	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 15% Isopropanol
Puffer QF (Elutionspuffer)	
Puffer EB (Elutionspuffer)	10 mM Tris-HCL (pH 8,5)
<u>Plasmid Minipräparation</u>	Qiagen, Hilden
GTE-Lösung	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA mit H ₂ O auf gewünschtes Endvol. auffüllen, autoklavieren, bei 4 °C lagern
Lysepuffer	0,2 N NaOH, 1% SDS mit H ₂ O auf gewünschtes Endvol. auffüllen, jeweils frisch ansetzen!
5 M Kaliumacetatlösung	29,5 ml Eisessig + KOH-Pellets bis pH 8,0, mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen, <u>nicht autoklavieren</u> , Lagerung bei RT
Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA mit H ₂ O auf gewünschtes Endvol. auffüllen, autoklavieren, bei RT lagern
Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 20% Ficoll-400
T4 DNA Ligationpuffer (2x) (Rapid DNA Ligation Kit)	Roche, Mannheim
<u>Safranin-Färbelösung</u>	
Stammlösung	3,41 g Safranin-O in 100 ml 96% Ethanol
Gebrauchslösung	10 ml Stammlösung + 100 ml H ₂ O
<u>Sequencer Kit</u>	Applied Biosystems, Darmstadt
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix v.1.1	AmpliTaq®DNA Polymerase, ddNTPs
Sequenzierungspuffer (5x)	ohne Angaben
Template Supression Reagent (TSR)	Formamid
HiDi	Formamid
Performance Optimized Polymer (POP6™)	Polymerlösung zur Auftrennung von DNA- Fragmenten
Elektrophoresepuffer (10x)	ohne Angaben

Fortsetzung **Tabelle 2.9**: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
<u>Synthesizer-Reagenzien</u>	
Acetonitril (HPLC geeignet, H ₂ O Gehalt ≤ 30 ppm)	Roth, Karlsruhe
Aktivatorlösung	Tetrazol in Acetonitril (Eurogentec, Köln)
Ammoniaklösung, 30-33%	Roth, Karlsruhe
Argon 5.0	Westfalen AG, Münster
Cap-Mix A	2,6-Lutidin, Essigsäureanhydrid, Tetrahydrofuran (Eurogentec, Köln)
Cap-Mix B	10% 1-Methylimidazol, Tetrahydrofuran (Eurogentec, Köln)
Deblocking-Mix	3% Trichloressigsäure, Dichlormethan (Eurogentec, Köln)
Oxidizing Solution	3% Jodlösung, Pyridin, Tetrahydrofuran (Eurogentec, Köln)
Polystyrolsäulen (dA, dC, dT, dG)	Polystyrol 1000 + 3'-Base (Eurogentec, Köln)
Phosphoamidite (dA, dC, dT, dG)	Eurogentec, Köln
TAE-Puffer (50x)	242,2 g (= 2 M) Tris-Base, 18,7 g (= 50 mM) EDTA pro Liter, mit Essigsäure auf pH 8,0 einstellen
TBE-Puffer (10x)	890mM Tris-Base (pH 8,0), 890 mM Borsäure, 40 ml 0,5 mM EDTA
Trifluoressigsäure, 2 % in H ₂ O	Für 5 ml: 0,1 ml Trifluoressigsäure + 4,9 ml H ₂ O
<u>DNA-Gel Extraktion Kit</u>	
QIAquick spin columns	Qiagen, Hilden
Puffer QG (Bindungspuffer)	ohne Angaben
Puffer PE (Waschpuffer)	ohne Angaben
Puffer EB (Elutionspuffer)	10 mM Tris-HCL (pH 8,5)

2.1.9 Sonstige Materialien und Geräte

Tabelle 2.10: Materialien und Geräte

Material / Gerät	Hersteller
Brutschränke	Heraeus, Osterode
Cellulosenitratfilter, Porengröße 0,45 µm, Ø 45 mm	Sartorius, Göttingen
DNA-Sequencer ABI-Prism 310	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA-Synthesizer 391 PCR-Mate	Applied Biosystems, Darmstadt
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Merck (VWR), Hamburg
Elektrophorese Power Supply	Biozym, Hess. Oldendorf
Eppendorf-Caps (0,2 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg

Fortsetzung *Tabelle 2.10*: Materialien und Geräte

Material / Gerät	Hersteller
Eppendorf Kolbenhubpipetten, variabel (0,1-0,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
<u>Gelkammern</u>	Biozym, Hess. Oldendorf
Comphor Mini, Midi, Maxi	
Küvetten (Halbmikro)	Roth, Karlsruhe
Luminometer (Lucy 2)	Anthos, Krefeld
<u>Mikrotiterplatten</u>	
Luminometer-Platten MHK-Platten	DYNATECH MicroFOUR, USA Merck (VWR), Hamburg
Multistep-Pipette (8-Kanal)	Hirschmann, Eberstadt
Phasenkontrastmikroskop CX31	Olympus, Hamburg
Photomikroskop mit Videokameraaufsatz Hyper HAD	Zeiss, Jena und Sony, Japan
pH-Meter	WTW, Weilheim
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Reinstwasseranlage (Milli-Q synthesis)	Millipore, Eschborn
<u>Schüttelinkubatoren</u>	
Schüttelinkubator (Serie 25) Certomat R+H	New Brunswick, New Jersey, USA Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank, Hera safe	Heraeus, Osterode
Speed Vac SDC 100	Savant, USA
Spektralphotometer (Cary 50)	Varian, Darmstadt
Sterilfilter, 0,2 µm, 7 bar	Sartorius, Göttingen
Sterilwerkbank, Hera gard	Heraeus, Osterode
<u>Thermocycler</u>	
T3, TGradient	Biometra, Göttingen
Thermopapier, Sony UPP-110HP	Biometra, Göttingen
Thermo-Printer, Sony UP-D890	Biometra, Göttingen
Video-Dokumentationsanlage BioDoc	Biometra, Göttingen
Video-Dokumentationsanlage ProviDoc	Sarstedt-Gruppe, Wiesloch
Video-Dokumentationsanlage UviProChemi (Densitometer)	UVItec Limited, Cambridge, UK
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	Julabo, Seelbach
<u>Zentrifugen</u>	
Biofuge pico Biofuge fresco Biofuge stratos (Rotoren #3331, #3332, #3335, #3046)	Heraeus, Osterode Heraeus, Osterode Heraeus, Osterode

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Mikrobiologie

2.2.1.1 Übernachtkultur

Für den Ansatz einer Übernachtkultur (ÜNK) wurden – abhängig von der Koloniegröße – von einer Chinablau-Laktose- bzw. LB-Agar-Platte ein bis drei Kolonien des gewünschten Stammes entnommen und in 3 ml steriler NI- bzw. LB-Bouillon suspendiert. Bei der Anzucht von Plasmid tragenden Stämmen wurde dem Medium zusätzlich das entsprechende Selektionsantibiotikum in ausreichender Konzentration zugesetzt. Die beimpfte Bouillon wurde anschließend für 14 bis 16 h bei 37 °C und 130 upm bebrütet.

2.2.1.2 Anlegen und Ausimpfen einer Glycerinkultur

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. In ein Probenröhrchen mit Schraubverschluss wurden je 0,5 ml NI-Bouillon und Glycerin (Endkonzentration 43,5%) pipettiert und zusammen mit 10 Glasperlen autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen wurden anschließend ein bis zwei Kolonien in das Probenröhrchen gegeben und mit dem Glasperlen enthaltenden Medium gut vermischt. Nach 30 min bei RT wurde die Flüssigkeit oberhalb der Glasperlen abgenommen und die Glycerinkultur bei –80 °C eingefroren bzw. gelagert.

Mit einer ausgeglühten und abgekühlten Platinöse wurde der Dauerkultur bei Bedarf eine Glasperle entnommen und die daran anhaftenden Bakterien durch Abrollen der Perle auf eine Agar-Platte – bei Plasmid tragenden Stämmen enthielt diese das entsprechende Selektionsantibiotikum – aufgebracht. Im Anschluss wurden die Bakterien durch das Drei-Ösen-Ausstrich-Verfahren auf der Platte verteilt. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.2.1.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Ein Maß für die Empfindlichkeit eines Bakterienstammes gegenüber einem Antibiotikum stellt die minimale Hemmkonzentration (MHK) dar. Es handelt sich dabei um die Antibiotikumkonzentration, bei der unter standardisierten Bedingungen kein sichtbares Wachstum mehr erfolgt.

Die Bestimmung der MHK erfolgte mit Hilfe der Mikro-Bouillondilutionsmethode in Mikrotiterplatten (261). Das Testvolumen betrug 100 µl pro Kavität.

Zu Beginn wurden die Testantibiotika in Mueller-Hinton-Bouillon gelöst und in einer geometrischen Reihe 1:2 in Mueller-Hinton-Bouillon verdünnt. Von jeder Konzentrationsstufe wurden 50 µl in die 1. bis 11. Kavität einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die 12. Kavität wurde mit Mueller-Hinton-Bouillon ohne Antibiotikum befüllt. Sie diente als Wachstumskontrolle. Im Anschluss wurden von einer frischen Übernachtskultur 1-3 Kolonien in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und die Bakteriensuspension photometrisch (OD_{550nm}) auf eine Trübung, die einem McFarland Standard 0,5 entsprach (ca. 1×10^8 KBE/ml), eingestellt. Die Suspension wurde daraufhin 1:100 in Mueller-Hinton-Bouillon verdünnt. Je 50 µl des Inokulums wurden zu 50 µl der Antibiotikumverdünnungen bzw. 50 µl reiner Mueller-Hinton-Bouillon in die Mikrotiterplatte pipettiert (resultierende Keimzahl/Kavität = ca. 5×10^5 KBE/ml). Die Flüssigkeit in den Kavitäten wurde durch Anklopfen der Platte gemischt. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Abklebefolie verschlossen und für 18-24 h bei 37 °C bebrütet. Nach der Bebrütung der Platte wurde zuerst die Wachstumskontrolle abgelesen. Konnte kein Wachstum in dieser Kavität nachgewiesen werden, so durfte die Platte nicht ausgewertet werden und der Test musste wiederholt werden.

2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendkeimzahl der Bakterien wurde durch Auszählen der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) bestimmt. Die Probe wurde je nach der zu erwartenden Keimzahl über mehrere Zehnerpotenzen mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Enthielt die Probe ein Testantibiotikum, wurde dieses durch den Flüssigkeitsanteil der

Kochsalzlösung so verdünnt, dass kein weiteres Absterben der Bakterien bei Ausplattieren der Probe auf einen festen Nährboden zu erwarten war.

Je 50 µl der Verdünnungen wurden auf Chinablau-Laktose-Agar (bei Plasmid enthaltenden Stämmen wurde LB-Agar mit der entsprechenden Konzentration des Selektionsantibiotikums verwendet) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden nach 24 h und 48 h Bebrütungszeit ausgezählt und in KBE/ml umgerechnet. Dabei wurde die Koloniezahl mit dem Faktor 20 multipliziert und das Ergebnis durch die entsprechende Verdünnung geteilt (siehe Formel unten). Die zuletzt ermittelte Keimzahl wurde als Ergebnis gewertet. Die untere Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei Ausplattierung von 50 µl bei 20 KBE/ml.

Bei einer erwarteten Keimzahl unter 20 KBE/ml wurde 1 ml der unverdünnten Probe mit Hilfe eines sterilen Cellulosenitratfilters filtriert. Der Filter wurde anschließend mit 25 ml steriler, physiologischer NaCl gewaschen, auf eine Agar-Platte gelegt und bei 37 °C inkubiert (Inkubationszeiten siehe oben). Das Spülen des Filters war notwendig, um das Antibiotikum weitgehend zu entfernen und somit ein weiteres Absterben der Bakterien auf der Agar-Platte zu verhindern. Die Auszählung der Kolonien erfolgte wie oben bereits beschrieben.

$$\text{KBE/ml} = \frac{\text{Koloniezahl} \times a}{\text{Verdünnung}}$$

a bezeichnet den Umrechnungsfaktor für ein Testvolumen von 1 ml mit

a = 20 → bei Ausplattieren von 50 µl verdünnter bzw. unverdünnter Probe

a = 1 → bei Filtration von 1 ml Probe (unverdünnte Ansätze mit geringer Keimzahl)

2.2.1.5 Bestimmung der optimalen bakteriziden Konzentration

Die optimale bakterizide Konzentration (OBC) eines Antibiotikums gibt die Konzentration an, mit der die höchste Keimzahlreduktion eines Bakteriums erreicht wird (200, 252).

Zur Bestimmung der OBC eines Antibiotikums wurden logarithmisch wachsende Zellen in mehrere Ansätze à 10 ml Bakteriensuspension aufgeteilt, mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikums (0- bis 1.024-fache MHK) versetzt und für weitere 3 h

bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Lebendzellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Als OBC wurde die AB-Konzentration (angegeben als x-fache MHK) angegeben, bei der die höchste Keimzahlreduktion erreicht wurde.

2.2.1.6 Absterbekinetiken

Fluorchinolone können neben dem bakteriziden Grundmechanismus A (Wirkung auf teilende Zellen mit aktiver Proteinbiosynthese) drei weitere bakterizide Mechanismen besitzen – B, B₁ und C (251, 253). Die Anzahl der vorhandenen Mechanismen eines Fluorchinolons ist dabei mit seiner Wirkung auf Bakterien in verschiedenen physiologischen Stadien verbunden. Mechanismus B ist vorhanden, wenn die Substanz einen Effekt auf ruhende Zellen und Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese besitzt (202). Von Mechanismus B konnten zwei weitere Teilmechanismen abgeleitet werden. Fluorchinolone, die gegen Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese, nicht aber gegen ruhende Zellen wirksam sind, besitzen Mechanismus B₁ und im umgekehrten Falle Mechanismus C (251). Die Identifizierung der bakteriziden Mechanismen wird mit Hilfe von Absterbekinetiken vorgenommen und beruht auf der Abnahme der Lebendkeimzahl der Bakterien um 99,9% (entspricht einer Reduktion um 3 Zehnerpotenzen) nach dreistündiger Inkubation mit einem Fluorchinolon in verschiedenen Medien.

Erfolgt eine Keimzahlreduktion in NI-Bouillon (aktive Zellteilung und Proteinbiosynthese), so kann Mechanismus A nachgewiesen werden. Ein bakterizider Effekt in phosphatpufferter Kochsalzlösung – PBS unterbindet die Zellteilung durch Nährstoffmangel – und NI-Bouillon + Chloramphenicol [50 µg/ml] – Chloramphenicol hemmt die Proteinbiosynthese – spricht für Mechanismus B. Ist eine bakterizide Wirkung nur in PBS bzw. NI-Bouillon + Chloramphenicol erkennbar, weist dies auf die Mechanismen C bzw. B₁ hin.

In Absterbekinetiken mit den *E. coli* Stämmen WT, WT-4 und WT-3-1 wurden die zu testenden Antibiotika in zwei Konzentrationen eingesetzt, der 8-fachen MHK oder der OBC. Die Absterbekinetiken mit den *S. aureus* Stämmen ATCC 6538, Q48.1.2-1 und Q24.2.5-3 bzw. *S. intermedius* ATCC 29663 wurden nur unter Einbezug der OBC durchgeführt.

Zu Beginn eines Versuches wurde die Übernachtskultur eines Teststammes 1:10.000 in frischer NI-Bouillon verdünnt. Nach einer Vorinkubation bei 37 °C und 120 upm für 2 h (*E. coli* Stämme) bzw. 3 h (*S. intermedius*, *S. aureus* Stämme) wurde die Suspension in drei Ansätze zu je 10 ml aufgeteilt.

Bestimmung der bakteriziden Mechanismen A, B₁

Ein Ansatz wurde ohne weiteren Zusatz weiter inkubiert. Einem zweiten Ansatz wurden 50 µg/ml Chloramphenicol zugegeben, um die Proteinbiosynthese der Zellen zu hemmen. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h wurden die beiden Ansätzen mit der OBC bzw. der 8-fachen MHK des jeweiligen Antibiotikums versetzt und die Ansätze für 3 h bei 37 °C und 130 upm weiter inkubiert. Proben von jeweils 0,5 ml – zur Bestimmung der Lebendkeimzahl – wurden zum Zeitpunkt der Inokulation (0 h), bei der Aufteilung der Bakteriensuspension, der AB-Zugabe und anschließend über einen Zeitraum von 3 h stündlich entnommen.

Bestimmung des bakteriziden Mechanismus C

Für den dritten Ansatz wurde im Anschluss an die oben beschriebene Vorinkubationszeit 10 ml der Bakteriensuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei RT und 5300 upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml isotonischem Phosphatpuffer (PBS), pH 7,4, resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 3 h bei 37 °C und 120 upm in PBS (stoppt die Zellteilung auf Grund von Nährstoffmangel), bevor das Antibiotikum zugegeben wurde. Nach der Zugabe des Antibiotikums wurde der Ansatz für weitere 3 h inkubiert. Proben von jeweils 0,5 ml – zur Bestimmung der Lebendkeimzahl – wurden zum Zeitpunkt der Inokulation (0 h), nach der Aufnahme der Zellen in PBS und anschließend stündlich über einen Zeitraum von 6 h entnommen.

Mechanismus B war vorhanden, wenn sowohl Mechanismus B₁ als auch Mechanismus C nachgewiesen werden konnte.

2.2.1.7 Mikroskopischer Nachweis zellmorphologischer Veränderungen

Parallel zur Bestimmung der minimalen SOS-induzierenden Konzentration (2.2.2.11) wurden die durch Chinolone hervorgerufenen Veränderungen der Zellmorphologie, z.B. Filamentierung, von *E. coli* Zellen unter dem Lichtmikroskop verfolgt. Zur Verstärkung des Kontrastes wurden Chinolon behandelten bzw. nicht behandelten Zellen mit Safranin angefärbt.

Nach guter Durchmischung wurde den Ansätzen je 10 µl Probe zu den Zeitpunkten der Antibiotikum-Zugabe und nach 70 min Inkubation mit dem jeweiligen Chinolon entnommen und auf einem sauberen Objektträger verteilt. Der Trocknung bei RT folgte die Fixierung der Zellen, in dem der Objektträger mit der Präparatseite nach oben dreimal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen wurde. Das Präparat wurde daraufhin mit Safraninlösung bedeckt und 60 sec gefärbt. Im Anschluss wurde die Färbung durch Spülen des Objektträgers mit Leitungswasser beendet und das getrocknete Präparat im Hellfeld mit dem 100x Objektiv mikroskopiert. Ausschnitte der Präparate wurden mit einem Photomikroskop photographisch dokumentiert.

2.2.1.8 Identifizierung grampositiver Bakterien mit API ID32 Staph

Die Identifizierung von *S. intermedius* erfolgte mit Hilfe eines miniaturisierten Systems, ID32 Staph, der Firma Biomeri ux, das auf dem Nachweis Species-spezifischer, biochemischer Reaktionsmuster beruht.

Mit H₂O wurde eine Bakteriensuspension hergestellt, die einem McFarland Standard 0,5 (ca. 1×10^8) entsprach. Anschließend wurden die Vertiefungen des ID32 Staph Teststreifens mit 50 µl der Bakteriensuspension befüllt. Nach Überschichtung einzelner Reaktionen mit Paraffinöl wurde der Teststreifen in eine mit 5 ml H₂O versehene Inkubationswanne gelegt, abgedeckt und bei 37 °C für 24 h bebrütet.

Die Auswertung erfolgte visuell. Nach dem Notieren des Ergebnisses auf einem speziellen Protokollstreifen ergab sich ein 9-stelliger Zahlencode anhand dessen die Bakterien-species identifiziert werden konnte.

2.2.1.9 Selektion Chinolon resistenter Mutanten

Die Selektion Chinolon resistenter Mutanten wurde auf festen Nährmedien durchgeführt (in Anlehnung an Heisig und Tschorny, 1994).

Für die Selektion wurden Übernachtskulturen von *E. coli* WT, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. intermedius* ATCC 29663 15 min bei 4 °C und 5300 upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in $1/20$ (bei *S. intermedius* $1/40$) des Ausgangsvolumens in steriler, physiologischer NaCl aufgenommen (resultierende Zellzahlen: *E. coli* WT = ca. 10^{11} Zellen, *S. aureus* ATCC 6538 = ca. 10^{10} Zellen bzw. *S. intermedius* ATCC 29663 = ca. 10^9 Zellen). Die gesamte Zellsuspension eines Stammes wurde auf je 10 Chinablau-Laktose-Agar-Platten – versehen mit einer bestimmten Antibiotikumselektionskonzentration von mindestens der 2-fachen und höchstens der 32-fachen MHK – ausplattiert. Die Selektion resistenter Mutanten von *E. coli* WT und *S. aureus* ATCC 6538 erfolgte mit den Chinolonen Pradofloxacin und Enrofloxacin. Im Falle von *S. intermedius* ATCC 29663 wurden Pradofloxacin und Ciprofloxacin verwendet. Zusätzlich wurde in jedem Versuch eine Kontrollplatte ohne Antibiotikum zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl angelegt. Die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) wurden nach 24 h und 48 h Bebrütungszeit ausgezählt (nicht bewachsene Platten wurden bis zu 7 Tagen weiter inkubiert), in KBE/ml umgerechnet und die Mutationsfrequenz mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Mutationsfrequenz} = \frac{\text{KBE/ml Selektionsplatte}}{\text{KBE/ml Kontrollplatte}}$$

Durch erneutes Ausplattieren von bis zu 10 Einzelkolonien pro Selektionskonzentration auf einer frischen Agar-Platte mit der gleichen Selektionskonzentration wurden die Mutanten gereinigt.

Die gereinigten Mutanten wurden in einer Mikrotiterplatte in je 100 µl NI-Bouillon angeimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden diese Übernachtskulturen 1:100 in NaCl verdünnt und im Agardilutionsverfahren einer ersten Charakterisierung unterzogen. Dazu wurde je 1 µl der jeweiligen verdünnten Bakteriensuspension mit einem Applikationsstempel auf mehrere Selektionsplatten und eine Kontrollplatte ohne Antibiotikum gestempelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 bis 48 h wurden die

Platten auf Wachstum der Mutanten untersucht. Mutanten, die ein Wachstum auf Platten mit der entsprechenden Selektionskonzentration bzw. mit einer höheren AB Konzentration zeigten, wurden durch Sequenzierung (s. **2.2.2.9**) weiter charakterisiert.

2.2.1.10 Stabilität der Mutationen

Zur Überprüfung der Stabilität der durch Sequenzierung nachgewiesenen Mutationen wurden die Mutanten 10x in Antibiotikum freiem Medium passagiert. Für die erste Passage wurden 5 ml NI-Bouillon mit einer Kolonie der entsprechenden Mutante beimpft und über Nacht bei 37 °C und 130 upm bebrütet. Dieser ÜNK wurde 25 µl Bakterien suspension entnommen und mit 4,975 ml NI-Bouillon gemischt und wiederum bei 37 °C über Nacht bebrütet. Mit den nächsten Passagen, außer der fünften Passage, die auf festem Nährmedium zur Kontrolle auf Verunreinigungen ausplattiert wurde, wurde ebenso verfahren. Für die zehnte Passage wurde 1 ml Bakterien suspension zu 199 ml NI-Bouillon gegeben und über Nacht bei 37 °C und 130 upm bebrütet. Die Bakterien suspension wurde 20:1 eingengt und wieder auf die entsprechende Selektionskonzentration, sowie auf eine Kontrollplatte ohne Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden 24 h bebrütet und die Keimzahlen auf beiden Platten bestimmt und miteinander verglichen. Bei einer stabilen Mutation müsste die entsprechende Mutante sowohl auf der Kontrollplatte als auch auf der Antibiotikum enthaltenden Platte wachsen.

2.2.2 Methoden der Molekulargenetik

2.2.2.1 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

2.2.2.1.1 Herstellung von Oligonukleotiden

Einige der in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe des DNA-Synthesizers 391 PCR-Mate (Applied Biosystems) hergestellt. Das automatisierte Verfahren beruht auf der Festphasensynthese nach Merrifield (243). Dabei werden aktivierte Monomere an eine wachsende Kette, die an einer unlöslichen Matrix gebunden ist, synthetisiert.

Als aktivierte Monomere dienen protonierte Desoxyribonucleosid-3'-phosphoramidite (32). Das erste Nukleotid ist durch einen Succinat-Linker mit dem Trägermaterial (z.B. Polystyrol) verbunden. Im ersten Schritt des Kettenverlängerungsverfahrens wird das 3'-Phosphoratom des neu hinzukommenden Desoxyribonucleosid-3'-phosphoramidits unter Bildung eines Phosphitriesters an das 5'-Sauerstoffatom des vorherigen Nukleotids gebunden (355). Diese Kopplung erfolgt unter wasserfreien Bedingungen, da die Phosphoramidit-Gruppe mit Wasser reagieren kann. Die Verknüpfung der Nukleotide verläuft selektiv, da die 5'-OH-Gruppe des aktivierten Monomers durch eine Dimethoxytrityl-(DMT)-Schutzgruppe blockiert ist. Ebenfalls ist die Aminogruppe der Purin- bzw. Pyrimidinbase durch Benzoyl oder iso-Butyryl geschützt. Im nächsten Schritt erfolgt die Oxidation des Phosphitriesters mit Jod zum Phosphotriester. Anschließend wird die DMT-Schutzgruppe am 5'-OH-Ende der wachsenden Nukleotidkette durch Trichloressigsäure abgespalten. Die Oligonukleotidkette ist somit um eine Einheit verlängert und für einen weiteren Additionszyklus bereit.

Nach Eingabe der zu synthetisierenden Primersequenz in 5' → 3' Richtung und Bestückung des Synthesizers mit den entsprechenden Synthese-Reagenzien wurde eine Säule, die bereits die 3'-Base des zu synthetisierenden Primers enthielt, in den Synthesizer eingesetzt und die Synthese gestartet. Nach Beendigung der Synthese wurde die Säule mit 2 ml Ammoniak (30-33%ig) gespült und bei RT für 1 h inkubiert. Durch den Ammoniak erfolgte zum einen die Abspaltung der Oligonukleotide von der Säule, zum anderen wurden die nach der Verknüpfung der Nukleotide an den Phosphatresten verbliebenen Cyanoethylschutzgruppen entfernt. Die Abspaltung der Basenschutzgruppen erfolgt nur langsam. Deshalb wurde die Oligonukleotid-Ammoniak-Lösung in gut verschließbare Gefäße gefüllt und über Nacht bei 60 °C inkubiert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde die Lösung bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde das Oligonukleotid-Ammoniak-Gemisch unter Vakuum in der Speed Vac für 3 h einrotiert. Nach der vollständigen Trocknung wurden die Primer bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.1.2 OPC-Reinigung von Oligonukleotiden

Nach Beendigung einer „Trityl-ON“-Primersynthese liegt das 5'OH-Ende des Oligonukleotids mit Dimethoxytrityl (DMT) als Schutzgruppe derivatisiert vor. Bei der Aufreinigung über eine Affinitätssäule werden ausschließlich DMT markierten Primer gebunden.

Die Equilibrierung der Säule erfolgte zuerst mit 5 ml Acetonitril (HPLC Reinheitsgrad) und anschließend mit 5 ml Triethylaminacetat. Die Primer-Ammoniaklösung (s. **2.2.2.1.1**) wurde 1:3 mit H₂O verdünnt und mit Hilfe einer Einmalspritze auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde wiederum auf die Säule geladen. Diese Prozedur wurde weitere zwei- bis dreimal wiederholt. Pro Säulengang wurden somit 1 bis 5 OD der DMT markierten Oligonukleotide aus dem Primerpool an die Säule gebunden. Die Säule wurde anschließend dreimal mit je 5 ml 3%iger Ammoniumhydroxidlösung und zweimal mit 5 ml Reinstwasser gewaschen. Die Abspaltung der DTM-Schutzgruppe erfolgte mit 5 ml 2%iger Trifluoressigsäure. Dazu wurde zunächst 1 ml auf die Säule gegeben und nach einer Einwirkungszeit von 2-3 min die restlichen 4 ml auf die Säule geladen. Der Nebeneffekt dieser Behandlung ist, dass nach Abspaltung der DTM-Schutzgruppen die Oligonukleotide im sauren pH-Bereich unspezifisch an die Säulenmatrix gebunden bleiben. Im Anschluss wurde die Säule zweimal mit je 5 ml Reinstwasser gespült. Die Elution der Primer erfolgte mit 1 ml 20%igem Acetonitril. Die Trocknung der Primer und die Bestimmung der Konzentration wurde, wie unter **2.2.2.1.1** bzw. **2.2.2.1.3** beschrieben, durchgeführt.

2.2.2.1.3 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

Die getrockneten Primer (s. **2.2.2.1.1** / **2.2.2.1.2**) wurden in 50 µl Reinstwasser aufgenommen. 5 µl dieser Lösung wurden 1:200 in Reinstwasser verdünnt und bei 260 nm in Glasküvetten photometrisch vermessen. Die Konzentration der Oligonukleotidlösung wurde mit der nachfolgenden Formel errechnet:

$$C_{\text{Primer}} [\text{pmol}/\mu\text{l}] = \frac{\text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung}}{\text{bp} \times 0,01}$$

Im Anschluss wurden die Primer mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 10 pmol/ μl eingestellt.

2.2.2.2 Isolierung von chromosomaler DNA

2.2.2.2.1 DNA-Isolierung aus gramnegativen Bakterien

Die chromosomale DNA aus *E. coli* Zellen wurde durch Aufkochen der Zellen isoliert. Ein bis drei Kolonien eines *E. coli* Stammes wurden dazu in 100 μl Reinstwasser suspendiert und bei 95 °C für 15 min inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt für 3 min bei 13.000 upm wurde die chromosomale DNA von den Zellresten getrennt und der Überstand in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Zur Überprüfung der Isolierung wurden 5-10 μl des Überstandes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Bei erfolgreicher Isolierung wurde der Überstand bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung (z.B. in der PCR) gelagert.

2.2.2.2.2 DNA-Isolierung aus grampositiven Bakterien

Für die Isolierung von chromosomaler DNA aus Staphylokokken war die Zugabe des Enzyms Lysostaphin erforderlich. Dazu wurden ein bis drei Kolonien in 100 μl Reinstwasser suspendiert. Es folgte die Zugabe von 2 μl Lysostaphin [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$]. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C eingefroren. Die Separierung der chromosomalen DNA von den Zellresten erfolgte durch Zentrifugation (3 min bei 13.000 upm, RT). Das weitere Vorgehen entspricht dem unter Punkt 2.2.2.2.1 beschriebenen Vorgehen.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.2.3.1 Plasmid-Minipräparation nach Birnboim und Doly (modifiziert)

Diese Methode ist besonders geeignet für eine schnelle Plasmid-Präparation aus vielen Proben, z.B. zum Screening auf Plasmid enthaltende Klone nach einer Transformation (38). Sie beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dabei denaturiert die chromosomale DNA vollständig bei einem stark alkalischen pH-Wert. Bei der superspiralisierten Plasmid-DNA hingegen werden die Wasserstoffbrückenbindungen bei stark alkalischem pH-Wert zwar aufgebrochen, jedoch bleiben ihre DNA-Einzelstränge mit einander verknüpft. Während der anschließenden Renaturierung nach der Neutralisation mit Kaliumacetat können die Plasmid-DNA-Einzelstränge korrekt zueinander finden. Die chromosomalen DNA-Einzelstränge finden hingegen nicht mehr zueinander. Die chromosomale DNA kann somit in einem Zentrifugationsschritt pelletiert und entfernt werden.

Pro Klon wurden 1,5 ml der jeweiligen Übernachtskultur bei 13.000 upm für 1 min abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl GTE-Puffer vollständig resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch die Zugabe von 200 µl frisch angesetzttem, alkalischem Lysepuffer. Nach mehrmaligem Invertieren der Probe und einer Inkubation von 5 min bei RT wurde der Ansatz durch Zugabe von 150 µl Kaliumacetat-Lösung neutralisiert und für 10 min bei RT weiter inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA von bakteriellen Zelltrümmern und der chromosomalen DNA erfolgte durch Zentrifugation (15 min, 13.000 upm, RT). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 0,8 ml absolutem Ethanol gemischt. Nach 2 min wurde die präzipitierte Plasmid-DNA bei 17.000 upm für 15 min abzentrifugiert und das erhaltene Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Der anschließenden Zentrifugation (5 min, 15.000 upm, RT) folgte die Trocknung des Pellets (ca. 10 min, 37 °C). Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 30-40 µl EB-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3.2 Plasmid-Minipräparation nach QIAGEN

Diese Methode beruht ebenfalls auf dem in Punkt **2.2.2.3.1** erläuterten Prinzip der alkalischen Lyse. Durch die verlängerten Reaktionszeiten und die Verwendung von RNase

als Pufferzusatz erhöht sich die Reinheit der Plasmide. Somit wurde die Aufreinigung nach QIAGEN für den anschließenden Einsatz von Plasmid-DNA in der PCR, der Sequenzierung oder der Klonierung verwendet.

3 ml einer ÜNK wurden bei 13.000 upm, für 1 min bei RT in einem Eppendorf-Cap abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 150 µl Puffer P₁ (+ 20 µg/ml RNase) resuspendiert. Nach dem Zusatz von 150 µl Lysispuffer P₂ wurde das Reaktionsgefäß invertiert und für exakt 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 150 µl eisgekühltem Neutralisierungspuffer P₃ wurde die genomische DNA ausgefällt und nach einer 20 min Inkubationszeit bei RT, 20 min bei 13.000 upm sedimentiert. Der klare Überstand wurde mit 2x Volumen 100%igem Ethanol gemischt und bei RT für 20 min und 17.000 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol für 5 min, bei 15.000 upm und RT gewaschen, der Überstand wiederum verworfen und das gewaschene Pellet nach der Trocknung (37 °C, 5-10 min) in 40 µl EB-Puffer aufgenommen.

Plasmid-DNA von Endonuklease bildenden Stämmen wurde zusätzlich unter Zuhilfenahme einer DNA-bindenden Säule gereinigt, wodurch der Abbau der DNA durch die Endonuklease verhindert werden konnte (Vorgehen wie **2.2.2.6.1**).

2.2.2.3.3 Plasmid-Midipräparation nach QIAGEN

Für die Präparation von „low copy“ Vektoren oder dem Bedarf größerer Mengen Plasmid-DNA sind höhere Kulturvolumina als bei der Minipräparation (**2.2.2.3.1 / 2.2.2.3.2**) erforderlich. Hierfür wurde das Plasmid-Midikit der Firma QIAGEN verwendet. Das Prinzip der Plasmidgewinnung basiert wie bei den vorher beschriebenen Plasmidpräparationen auf der alkalischen Lyse.

100 ml ÜNK wurden für 15 min bei 4 °C und 5300 upm abzentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml Puffer P₁ resuspendiert. Das Gemisch wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, nach Zugabe von 4 ml Lysepuffer P₂ 3 bis 4 mal invertiert und für exakt 5 min bei RT inkubiert. Zur Neutralisation wurde das Lysat mit 4 ml eiskaltem Puffer P₃ gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4 °C und 15.000 upm. Enthielt der Überstand noch Zellreste wurde ein zweites Mal zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine vorher mit 4 ml Equilibrationspuffer QBT behandelte Säule (QIAGEN-tip 100) pipettiert. Während

des Durchflusses durch die Säule erfolgte die Bindung der Plasmid-DNA an ein Anionen-Austauscher-Harz mit positiv geladenen DEAE-Gruppen. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml QC Puffer gewaschen. Das Eluat wurde nach Behandlung der Säule mit 5 ml QF-Elutionspuffer in einem neuen Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt und durch eine 30 min Zentrifugation bei 15.000 upm und RT pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 15.000 upm für 10 min zentrifugiert. Das für 10-20 min bei 37 °C getrocknete Pellet wurde in 50 µl EB-Puffer gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 DNA-Amplifikationstechniken

2.2.2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine In-vitro-Technik, die zur Amplifikation und Modifikation von DNA eingesetzt wird (323). Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist die Kenntnis der Sequenzbereiche, die das zu amplifizierende Fragment flankieren. Aus diesen Bereichen werden die Sequenzen der Oligonukleotidstartermoleküle, Primer, abgeleitet. Die Primer binden gegenläufig komplementär an die DNA.

Die Anzahl der Template-DNA steigt während der Reaktion „theoretisch“ durch zyklische Verdopplung exponentiell an. Die Praxis zeigt jedoch, dass die exponentielle Phase auf Grund stochastischer Effekte erst nach 10 Zyklen beginnt und nach 30 Zyklen in Folge einer Reaktionshemmung beendet wird. Verantwortlich für die Hemmung sind z.B. der Aktivitätsverlust der Polymerase und die Bildung von Pyrophosphat.

Jede PCR benötigt ein spezifisches Temperaturprofil. Die Annealingtemperatur sollte 3 bis 5 °C (263) unterhalb der Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegen.

Die Schmelztemperatur errechnet sich nach folgender Formel:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (\Sigma d\text{ATP} + \Sigma d\text{TTP}) + 4 \times (\Sigma d\text{GTP} + \Sigma d\text{CTP})$$

Das Temperaturprofil einer PCR besteht aus folgenden Schritten:

1) Initialdenaturierung	95 °C	2-5 min	
2) Denaturierung	95 °C	x sec	} 30-36x
3) Annealing	T _A °C	x sec	
4) Elongation	T _P °C	x sec	
5) (Annealing	T _A °C	x sec)	
6) verlängerte Elongation	T _P °C	5-10 min	

T_A °C = Annealingtemperatur
T_P °C = Temperatur abhängig
von gewählter Polymerase

Die Dauer der Verlängerungsreaktion ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Syntheserate der verwendeten DNA-Polymerase.

Zur Durchführung einer PCR sind folgende Komponenten in einem Testansatz (**Tabelle 2.11**) obligatorisch:

Tabelle 2.11: PCR-Standardansatz

Reagenz	Volumen
10x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer	10 µl
MgCl ₂ [25 mM]	8 µl
Primer 1 [10 pmol/µl]	2µl
Primer 2 [10 pmol/µl]	2µl
dNTP-Mix [2 mM]	2,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl
DNA-Matrize	x µl
Reinstwasser	ad 100 µl

Als negative Amplifikationskontrolle sollte bei jeder PCR in einem Ansatz Reinstwasser statt Template enthalten sein.

Die Überprüfung des Amplifikationsproduktes erfolgt mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (**2.2.2.5**)

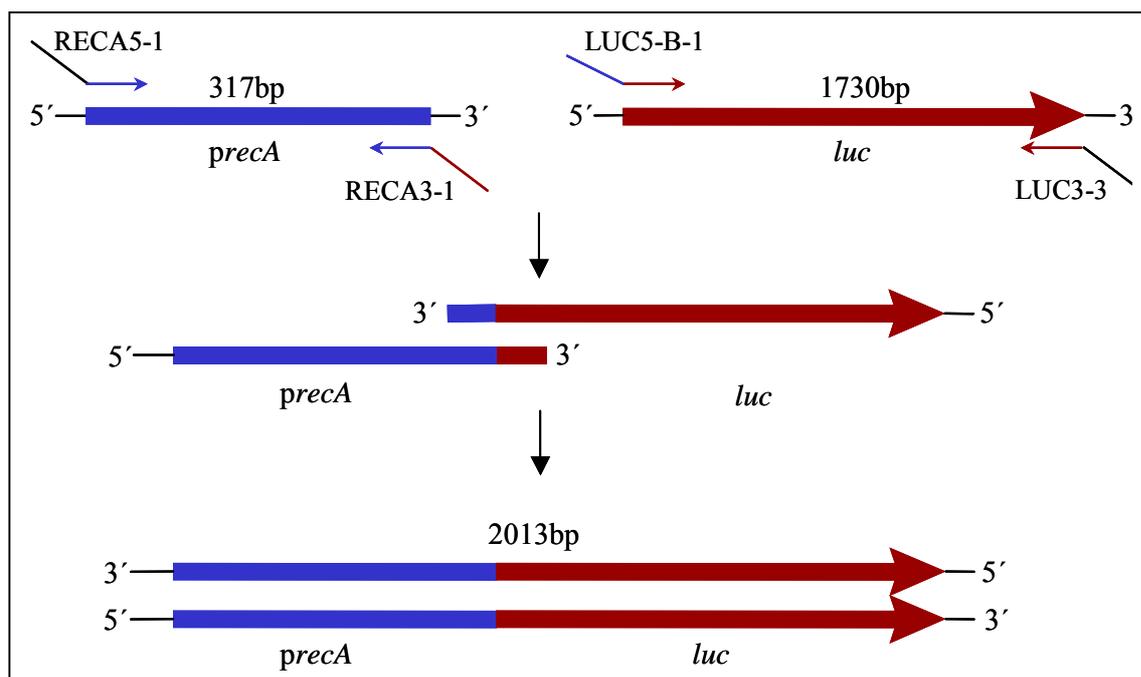
Da in der vorliegenden Arbeit verschiedene PCRs durchgeführt wurden, sind die Angaben zu den jeweiligen Ansätzen und Temperaturprofilen den entsprechenden Versuchen zugeordnet.

2.2.2.4.2 PCR-Fusions-Technik (SOEing)

SOEing (splicing by overlap extension), eine spezielle Anwendung der PCR, ermöglicht eine definierte Verknüpfung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Herkunft.

Diese Technik basiert darauf, dass die Primer für zwei zu fusionierende DNA-Fragmente jeweils am 5'-Ende des Überlappungsbereiches komplementäre Bereiche zum jeweils anderen DNA-Fragment einführen. Mischt man die beiden Amplifikate miteinander, so hybridisieren sie an den zueinander komplementären Bereichen. Die durch die Hybridisierung resultierenden 3'OH-Enden dienen nun als Startermoleküle und werden durch eine DNA-Polymerase verlängert, wodurch das gewünschte DNA-Fusionsprodukt entsteht (*Abbildung. 2.1*).

Abbildung 2.1: SOEing-Technik am Beispiel der Fusion des *recA*-Promotors und des *luc*-Gens



Amplifikate der *Taq*-Polymerase weisen eine hohe Fehlerquote auf. Daher wurde das Fusionsprodukt mit Hilfe der Expand-High-Fidelity-Polymerase hergestellt. Diese besitzt durch ihre Proofreading-Funktion eine höhere Genauigkeit, so dass die Zahl während der PCR auftretender Mutationen reduziert wird.

2.2.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, welches auf der Wanderung geladener Moleküle durch eine poröse Matrix im elektrischen Feld beruht (224). Ein elektrophoretisches Trennverfahren ist die Agarosegelelektrophorese, mit deren Hilfe DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden. Die DNA wandert auf Grund ihrer – unter dem gegebenen pH-Wert – negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Das Agarosegel bildet dabei eine Art Molekularsieb, in dem die Wanderung größerer DNA-Fragmente stärker behindert wird als die kleinerer Fragmente.

Für die Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurden Horizontalapparaturen unterschiedlicher Größe verwendet. Der Agaroseanteil der Gele lag zwischen 0,7 und 1%, abhängig von der erwarteten Größe der aufzutrennenden DNA. Die Agarose wurde in 0,5x TAE- bzw. 0,5x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Herunterkühlen auf ca. 55 °C wurde Ethidiumbromid aus einer 10 mg/ml Ausgangslösung hinzugefügt, so dass eine Endkonzentration von 0,1µg/ml Ethidiumbromid erreicht wurde. Auf Grund seiner planaren Struktur interkaliert Ethidiumbromid in DNA-Doppelstränge. Durch UV-Licht (254-366 nm) kann der interkalierte Farbstoff angeregt werden, so dass DNA-Moleküle – an die Ethidiumbromid gebunden ist – im Agarosegel sichtbar werden (211). Die Agarose wurde in abgedichtete Gelträger gegossen, wobei zur Aussparung von Probenaschen ein Gelkamm eingesetzt wurde. Nach der Polymerisation wurde der Gelträger in der Apparatur zu den Elektroden ausgerichtet und das Gel vor der Entfernung des Gelkammes mit dem entsprechenden Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{10}$ Volumen Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die angelegte Spannung betrug im Allgemeinen zum Einlaufen der Proben 3 V/cm und wurde anschließend auf 5 V/cm erhöht. Nach Beendigung des Laufes wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage ausgewertet. Die DNA-Größe bzw. -Konzentration konnte mit Hilfe eines Markers (z.B. Smart Ladder), der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurde, bestimmt werden.

2.2.2.6 Aufreinigung von PCR-Produkten bzw. DNA-Fragmenten

2.2.2.6.1 DNA-Aufreinigung durch Verwendung von Silika-Säulen (QIAGEN)

Nukleinsäuren binden an Silicagel-Membranen in Anwesenheit hoher Konzentrationen eines chaotropen Salzes. Das Silicagel einer QIAquick Spin-Säule™ kann bis zu 10 µg DNA binden. Durch Waschschrte werden für die weitere Verwendung störende Komponenten, wie Primer, dNTPs, Polymerase, Salze oder Restriktionsenzyme, entfernt.

Für die Reinigung und Konzentrierung von DNA aus einem Reaktionsansatz (PCR, Restriktionsverdau) wurde der Ansatz mit dem 5-fachen Volumen Bindepuffer (PB-Puffer) gemischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Nach einer Zentrifugationszeit von 1 min bei 13.000 upm und RT wurde der Durchfluss verworfen, die Säule mit 500 µl PE-Puffer gewaschen und erneut zweimal nacheinander für 1 min bei 13.000 upm zentrifugiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit (2-5 min) wurde die Säule zweimal hintereinander für 1 min zentrifugiert, um den PE-Puffer zu entfernen. Anschließend wurde die Säule zur Verdampfung letzter Reste des PE-Puffers (Ethanolreste aus dem Puffer wirken sich störend auf die Rückgewinnung der DNA aus) für 2-5 min bei RT getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit 30-40 µl EB-Puffer nach einer Einwirkungszeit von 1 min durch zweimalige Zentrifugation bei 13.000 upm. Durch erneute Auftragung des Eluats und einen weiteren Zentrifugationsschritt konnte die Ausbeute um ca. 20% erhöht werden.

2.2.2.6.2 Isolierung von DNA aus Gelen nach QIAGEN

Das Prinzip der Reisolierung von DNA aus Agarosegelen besteht auf der Bindung von Nukleinsäuren an Silicagel-Membranen (s. auch **2.2.2.6.1**). Agarosereste und Salze werden durch Waschschrte entfernt, so dass nach der Elution die reine DNA zurückbleibt. Für die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cap überführt. Zu 100 mg Gelmatrix wurden 300 µl QG-Puffer gegeben und das Gel anschließend bei 50 °C für 10 min zum Schmelzen gebracht. Der Ansatz wurde während dieser Zeit 2-3 mal gemischt. Die Gellösung wurde mit Isopropanol (entspre-

chend dem einfachen Gelvolumen) versetzt und gut durchmischt. Das Gemisch wurde auf eine QIAquick-Säule pipettiert und nach einer Einwirkzeit von 1 min bei 13.000 upm und RT für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl QG-Puffer überschichtet und für eine weitere Minute bei 13.000 upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Nach einer kurzen Inkubationszeit (2-5 min) wurde die Säule zweimal hintereinander für 1 min zentrifugiert, um den PE-Puffer zu entfernen. Das weitere Vorgehen entspricht dem bereits in Punkt **2.2.2.6.1** beschriebenen Vorgehen.

2.2.2.7 Enzymatische DNA-Modifikation

2.2.2.7.1 Restriktionsverdau

Durch die Produktion von DNA abbauenden Enzymen, den Restriktionsendonukleasen, schützen sich Bakterien vor dem Eindringen fremder DNA. Die Enzyme erkennen dabei spezifische Nukleotidabfolgen und zerschneiden die artfremde DNA, während die eigene DNA durch Modifikationen vor dem Abbau geschützt ist. Für die Gentechnologie sind Restriktionsenzyme des Typs II von großem Nutzen, da sie spezifisch innerhalb der meist palindromischen Erkennungssequenz schneiden. Durch die Hydrolyse entstehen glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) Enden, die z.B. die Konstruktion rekombinanter Plasmide ermöglichen.

Die Menge und die Größe der zu schneidenden DNA-Moleküle, sowie die Anzahl der Schnittstellen für ein Restriktionsenzym, bedingen die Menge des einzusetzenden Restriktionsenzym:

$$\text{Unit Enzym} = \frac{\mu\text{g} \times (5 \times 10^4) \times S_v}{\text{bp DNA} \times S_\lambda \times h}$$

S_v = Schnittstellen im Vektor

S_λ = Schnittstellen in λ -DNA

h = Inkubationsdauer

In der Regel wurde für die Spaltung das Zwei- bis Dreifache der errechneten Enzymmenge eingesetzt, um eine komplette Restriktion zu gewährleisten. Der Restriktionsansatz erfolgte gemäß **Tabelle 2.12**.

Tabelle 2.12: Ansatz für einen Restriktionsverdau

Reagenz	Volumen
DNA	w μ l
Restriktionsenzym	x μ l
(Restriktionsenzym 2)	(y μ l)
100x BSA	$\frac{1}{100}$ Vol des Gesamtvoll
10x Enzympuffer	$\frac{1}{10}$ Vol des Gesamtvoll
Reinstwasser	z μ l

() = nur bei Doppelverdau

Das Volumen des in Glycerin gelösten Enzyms darf dabei höchstens $\frac{1}{10}$ des gesamten Ansatzvolumens ausmachen, da ansonsten der Glycerinanteil zu hoch ist und die Reaktion negativ beeinflussen kann. Für einen Doppelverdau mit zwei Enzymen wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität aufweisen. Ein solcher Puffer ist in der Regel in Katalogen des jeweiligen Herstellers (z.B. New England Biolabs) angegeben.

Die Inkubationszeit der Restriktionsansätze betrug 1-3 h (bei PCR-Produkten 3-6 h), die Inkubationstemperatur lag bei 37 °C.

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Ansätze zur Isolierung der geschnittenen DNA über QIAquick-Säulen gemäß **2.2.2.6.1** aufgereinigt.

2.2.2.7.2 Dephosphorylierung

Um die Religation eines mit einem Restriktionsenzym (z.B. *Pst*I) geschnittenen Vektors während der Ligation (s. **2.2.2.7.3**) zu verhindern, wurde die 5'-Phosphatgruppe des Vektors durch Behandlung mit Shrimp alkalischer Phosphatase abgespalten.

Dazu wurden 40 ng Vektor-DNA für 20 min bei 37 °C mit 1 μ l (entspricht 1 U) Shrimp alkalischer Phosphatase in 10x Dephosphorylierungspuffer inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65 °C für 20 min.

Zur Bestätigung der erfolgreichen Dephosphorylierung des Vektors wurden vier verschiedene Kontrollen angesetzt und durch nachfolgende Transformationen (s. **2.2.2.8.2**)

geprüft. Zwei Kontrollansätze (s. **Tabelle 2.13**) wurden jeweils mit Ligase (s. **2.2.2.7.3**) behandelt.

Tabelle 2.13: Kontrolltransformationen

Ansatz	Plasmid	dephosphoryliert	ligiert	erwartete Koloniezahl
1	linearisiert	-	-	<20
2	linearisiert	+	-	<20
3	linearisiert	-	+	>200
4	linearisiert	+	+	<20

Entsprach die Koloniezahl der transformierten Zellen der erwarteten Koloniezahl, so war das Plasmid für eine Klonierung geeignet.

2.2.2.7.3 Ligation geschnittener Fragmente mittels T4-Ligase

Die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen der 5'-Phosphatgruppe eines DNA-Fragmentes und der 3'-Hydroxylgruppe eines anderen DNA-Fragmentes wird durch Ligase katalysiert. Kohäsive, komplementär geschnittene DNA-Fragmentenden können auf diese Weise in vitro mit der T4-Ligase in einer ATP verbrauchenden Reaktion miteinander verknüpft werden.

Für die Ligation mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits wurde ein gespaltenes DNA-Fragment mit einem entsprechend gespaltenen, dephosphorylierten Vektor mit 1 U (= 1 µl) T4 DNA-Ligase für 30 min bei RT inkubiert. Der Vektorgehalt betrug in den Klonierungsansätzen 40 ng. Für eine erfolgreiche Ligation wurde ein molares Verhältnis zwischen Vektor und Insert von 1:4 gewählt. Nach der Inkubation wurde der gesamte Ligationsansatz für die Transformation (s. **2.2.2.8.2**) eingesetzt.

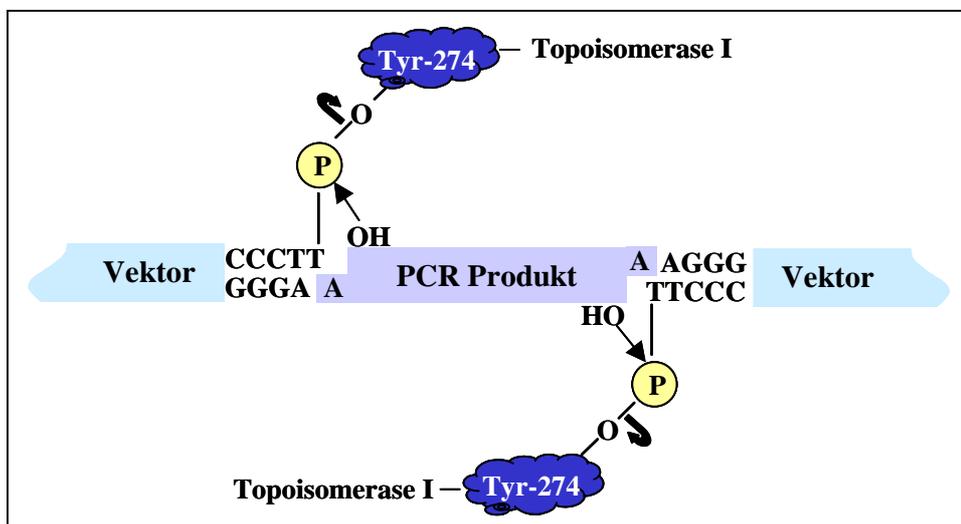
2.2.2.7.4 Ligation von PCR-Fragmenten mittels Topoisomerase I

Ist die herkömmliche Klonierung (Restriktion, Ligation, Transformation) eines Fragmentes in ein Plasmid nicht erfolgreich, so können dafür entweder eine unzureichende

Dephosphorylierung des Vektors oder eine mangelhafte Restriktion des Fragmentes verantwortlich sein. Lineare Fragmente mit Restriktionsschnittstellen nahe des 3'- oder 5'-Endes werden oft nur unvollständig durch die entsprechenden Enzyme geschnitten.

Um zunächst die Restriktion eines PCR-Fragmentes zu umgehen, kann das entsprechende Fragment mit Hilfe des TOPO TA Cloning[®] Kits (Invitrogen, USA) kloniert werden. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass die *Taq*-Polymerase keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern einen Überhang eines Desoxyadenosin-Nukleotids am 3'-Ende der PCR-Produkte erzeugt (254). Der linearisierte Vektor pCR2.1-TOPO besitzt komplementär dazu jeweils einen Desoxythymidin-Überhang, über den *Vaccinia* Topoisomerase I kovalent mittels einer Phosphotyrosyl-Bindung gebunden ist. Somit ist eine Selbstligation des Vektors ausgeschlossen. Bei der Ligation von Fragment und Vektor wird die Phosphotyrosyl-Bindung zwischen der Vektor-DNA und der Topoisomerase I durch das 5'-OH Ende des PCR-Fragments nucleophil angegriffen, was zur Freisetzung der Topoisomerase (342) und zur Ligation von Fragment und Vektor führt (s. **Abbildung 2.2**).

Abbildung 2.2: Klonierung in pCR2.1-TOPO



2.2.2.8 Übertragung von genetischem Material

2.2.2.8.1 Herstellung kompetenter Bakterien nach der CaCl_2 -Methode

Bei Bakterienspecies die keine natürliche DNA-Aufnahme besitzen, kann diese durch chemische Vorbehandlung der Zellen induziert werden (153). Die Vorbehandlung mit bivalenten Kationen, z.B. mit CaCl_2 , und die Aufbewahrung in der Kälte führt zu einer Veränderung der Zelloberfläche bzw. einer porösen Zellwand (35).

Zur Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl_2 -Methode (65) wurde eine ÜNK des jeweiligen Bakterienstammes 1:100 in NI-Bouillon verdünnt und bei 37 °C bei 200 upm bis zu einer $\text{OD}_{546\text{nm}}$ von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Nach Erreichen der OD wurde die Suspension für 5 min auf Eis abgekühlt, anschließend wurden 40 ml entnommen und bei 4 °C und 5300 upm für 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 5300 upm, 10 min) wurde das Pellet in 1 ml kalter 100 mM CaCl_2 -Lösung aufgenommen und über Nacht bei 4 °C auf Eis aufbewahrt. Die Lagerung erhöht die Kompetenz und somit die Effizienz der anschließenden Transformation um das Vier- bis Sechsfache. Bei einer Lagerungszeit über 24 h nimmt die Effizienz jedoch deutlich ab (71).

2.2.2.8.2 Transformation von CaCl_2 kompetenten Zellen

Für die Transformation von CaCl_2 -behandelten, kompetenten Zellen wurde die Bakterien suspension (s. 2.2.2.8.1) in 0,2 ml Portionen aufgeteilt. Je 0,2 ml kompetenten Zellen wurden mit 10 ng DNA versetzt. Einem Ansatz wurde keine DNA zugefügt, vielmehr wurde dieser zur Bestimmung der Lebendkeimzahl (s. 2.2.1.4) herangezogen und diente darüber hinaus als Negativkontrolle. Alle mit DNA versetzten Ansätze wurden für 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit lagerte sich die DNA an die Cytoplasmamembran an. In einem nachfolgenden Hitzeschritt von 42 °C für 100 sec wurde die Fluidität der Membran erhöht und somit die Aufnahme der DNA in die Zelle erleichtert. Nach 2-5 min Abkühlung auf Eis wurden die Ansätze mit 1 ml NI-Bouillon versetzt und bei 37 °C und 130 upm für 1,5 h inkubiert. Den Ansätzen wurden jeweils 10 μl , 50 μl ,

100 μ l, 200 μ l und 400 μ l der Zellsuspension entnommen und auf antibiotikahaltigen Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht bebrütet. Bis zu 100 Klone pro Ansatz wurden zur Reinigung nochmals auf die entsprechenden Selektionsplatten überimpft und nach erneuter Bebrütung weiterbearbeitet.

Für die Transformation eines rekombinanten pCR2.1-TOPO Vektors wurden in dieser Arbeit bereits kompetente *E. coli* TOP10F' Zellen (Invitrogen, USA) verwendet.

Der Vektor besitzt neben einer Kanamycinresistenzgenkassette, einen *lacZ*-Promotor und ein intaktes *lacZ*-Gen (codiert für β -Galactosidase). Durch Insertion eines DNA-Fragmentes wird der Leserahmen des *lacZ*-Gens zerstört und die Bildung von β -Galactosidase unterbunden. Nach der Transformation in kompetenten TOP10F' Zellen (exprimieren den *lac*-Repressor LacI, besitzen jedoch kein aktives *lacZ*-Gen) erfolgt die Selektion positiver Klone zum einen anhand ihrer durch das Plasmid erworbenen Kanamycinresistenz zum anderen durch einen Farbttest mit dem chromogenen Substrat X-Gal (blue-white-screening).

Die nach der Transformation erhaltenen Klone wurden auf LB-Selektionsplatten (Kanamycin 50 μ g/ml) übertragen, die zuvor mit jeweils 40 μ l X-Gal [40 μ g/ml] und 40 μ l IPTG [100 μ g/ml] versetzt worden waren. Dabei diente IPTG als Induktor der β -Galactosidase-Genexpression. Klone, die β -Galactosidase bilden, spalten X-Gal zu 5-Brom-4-Chlor-Indigo und erscheinen blau. Rekombinante Klone, in denen das *lacZ*-Gen durch Insertion eines Fragmentes (in dieser Arbeit *precA-luc*) zerstört ist und somit keine aktive β -Galactosidase mehr bilden, erscheinen als „weiße“, d.h. farblose Kolonien.

2.2.2.9 Sequenzierung

Die in dieser Arbeit verwendete, automatisierte DNA-Sequenzierung beruht auf dem von Sanger et al. entwickelten Kettenabbruchverfahren (327). Das zu sequenzierende DNA-Fragment wird in vitro in einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer (Cycle Sequencing) amplifiziert. Im Ansatz liegen neben der DNA-Matritze, der DNA-Polymerase, dem Primer und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten kleine Mengen von 2'-3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs) mit unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffmarkierung vor. Nach dem Einbau eines ddNTPs kommt es auf

Grund der fehlenden OH-Gruppe am C3-Atom der Desoxyribose, die für die Bildung einer Phosphodiesterbindung benötigt wird, zum Kettenabbruch. Da der Kettenabbruch einer statistischen Verteilung folgt, entsteht ein Gemisch von Fragmenten mit unterschiedlichen Kettenlängen mit einem durch den Sequenzierungsprimer definierten Ende. Im Anschluss erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe in einer Kapillarelektrophorese mit Hilfe des DNA-Sequenzers ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der ddNTPs kann die Cycle Sequencing Reaktion in einem Ansatz durchgeführt werden und die somit unterschiedlich markierten Fragmente mit Hilfe eines Lasers detektiert werden. Die Basensequenz der untersuchten DNA-Probe ergibt sich aus der Abfolge der auftretenden basenspezifischen Farbsignale. Die Farbsignale werden anschließend mit Hilfe einer Software (ABI-CE, Version 3.0, Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA) in die entsprechende Basenreihenfolge umgesetzt.

Für die Cycle Sequencing Reaktion wurden folgende Reagenzien verwendet:

Tabelle 2.14: 20 µl Ansatz für eine Cycle Sequencing Reaktion

Reagenz	Volumen
Sequenzierungspuffer [5x]	2,5 µl
Template: Lineares DNA-Fragment oder Plasmid	x µl [= 10-100 ng] x µl [= 200-500 ng]
DMSO (nur bei Plasmidsequenzierung)	1 µl
Primer [10 pmol/µl]	1 µl
Big Dye	3 µl
Reinstwasser	ad 20 µl

Bei der Sequenzierung von Plasmiden wurden alle Komponenten bis auf Big Dye zusammengegeben und für 5 min bei 96 °C vorinkubiert. Nach Zugabe von Big Dye wurde das untere Temperaturprofil gestartet. Die Annealingtemperatur kann bei der Plasmidsequenzierung bei 60 °C erfolgen. Im Falle der Sequenzierung von Fragmenten ist die Annealingtemperatur wie bei der PCR (s. 2.2.2.4.1) abhängig von der Schmelztemperatur des verwendeten Primers.

Das Cycle Sequencing wurde mit Hilfe des folgenden Temperaturprofils durchgeführt:

1) Initialdenaturierung	96 °C	2 min	} 25x
2) Denaturierung	96 °C	30 sec	
3) Annealing	48-60 °C	5 sec	
4) Elongation	60 °C	4 min	

Die Aufreinigung der Proben erfolgte durch eine Ethanol-Acetat-Fällung. Zu jedem 20 µl Ansatz wurden 80 µl Reinstwasser, 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 250 µl 100%iger Ethanol zugegeben. Nach guter Durchmischung erfolgte bei RT und 15.000 upm eine 25 min Zentrifugation. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt (Pellet ist nicht sichtbar) und das Pellet mit 400 µl frischem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 15.000 upm und RT wurden die Pellets für 30 min lichtgeschützt bei 37 °C getrocknet. Vor Beladung der Kapillare wurden die Pellets in 20 µl HiDi (reines Formamid) aufgenommen.

2.2.2.10 Screening auf Luciferaseaktivität

Das hier beschriebene Verfahren diente als Schnelltest zum Nachweis von Luciferaseaktivität in rekombinanten Klonen, da hier lediglich die absoluten Biolumineszenz Werte für Übernachtskulturen mit undefinierter Zelldichte bestimmt wurden.

Pro zu testenden Klon wurden zwei Kulturen angesetzt. Dazu wurden je 3 ml NI-Bouillon mit der entsprechenden Konzentration des jeweiligen Selektionsantibiotikums versehen und einem Ansatz zusätzlich Ciprofloxacin, als Induktor der *recA*-Genexpression, in einer subinhibitorischen Konzentration von 0,004 µg/ml zugegeben. Zellen des für die Transformation verwendeten Stammes ohne Plasmid wurden als Negativkontrolle mitgeführt, da ohne Reporter-genplasmid keine Luciferaseaktivität messbar sein sollte. Alle Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 130 upm inkubiert. Zu je 90 µl einer Übernachtskultur wurden 10 µl 1 M K₂HPO₄-Puffers (enthält 20 mM EDTA (pH 7,8)) pipettiert und 30 min bei -80 °C tiefgefroren. Anschließend wurden die Proben aufgetaut und mit je 300 µl Lysis Mix (100 µl Lysozym-Lösung [5 mg/ml] und 200 µl CCLR [2x] + BSA [5 mg/ml]) versetzt, gemischt und für 10 min bei RT inku-

biert. Für die Messung der Luciferaseaktivität wurden 10 μl lysierte Zellen mit 50 μl Luciferase-Assay-Reagent[®] (LAR) gemischt und die Lumineszenz bei einer Wellenlänge von 562 nm im Luminometer gemessen. Die Intensität des gemessenen Lichtsignals (RLU) korreliert mit der absoluten Luciferaseaktivität bzw. der in dieser Arbeit untersuchten *recA*-Induktion.

2.2.2.11 Bestimmung der minimalen SOS-induzierenden Konzentration (minimal SOS-inducing concentration, MSIC)

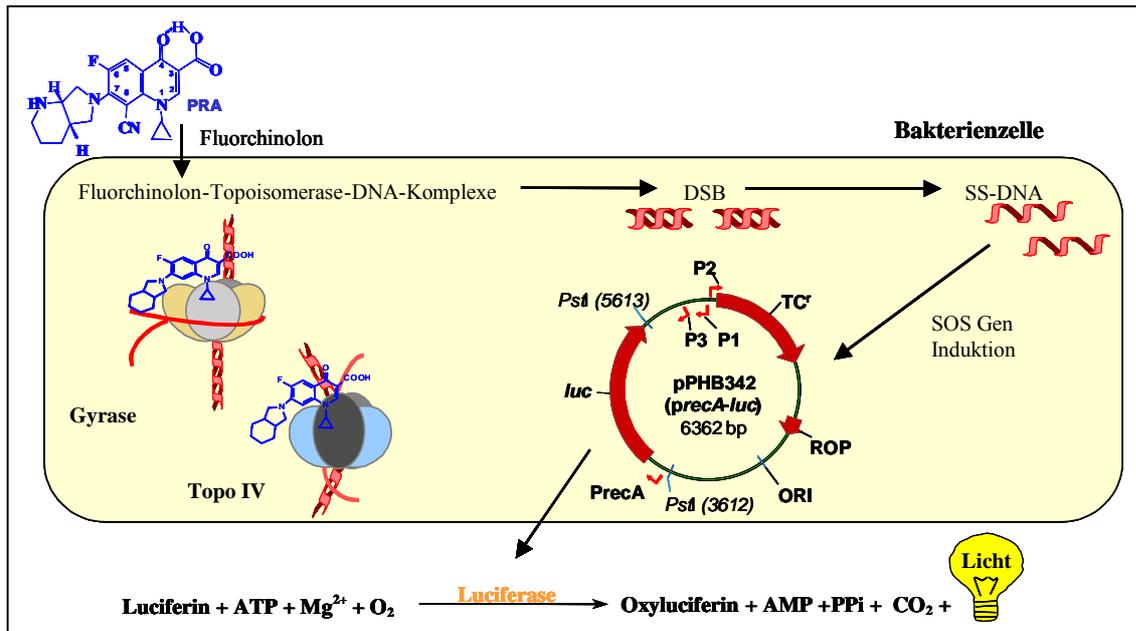
Die nachfolgend beschriebene Standardmethode zur Bestimmung der MSIC in *E. coli* Stämmen wurde basierend auf den Ergebnissen verschiedener Vorversuche (s. **3.2.2.2**) entwickelt.

Eine frische Übernachtskultur des zu untersuchenden *E. coli* Stammes wurde 1:200 in 10 ml LB-Bouillon verdünnt. Für jede Testkonzentration eines Fluorchinolons, sowie für die uninduzierte Kontrolle wurden jeweils drei parallele Kulturen angesetzt. Die Keimzahl zu diesem Zeitpunkt ($t=0$) – bestimmt als $\text{OD}_{546\text{nm}}$ -Wert und parallel als KBE/ml zur Überprüfung – lag zwischen $6,2$ und $8,4 \times 10^6$ KBE/ml. Den Kulturen wurde zusätzlich Tetracyclin in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt, um gegen den Verlust des Reporterplasmids zu selektieren. Anschließend wurden die Kulturen bei 37 °C unter Schütteln (130 upm) bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{546\text{nm}}$ von 0,06-0,08 inkubiert (was einer Lebendzellzahl von 1 bis $5,8 \times 10^7$ KBE/ml entsprach). Zu diesem Zeitpunkt wurden je drei Kolben mit einem Fluorchinolon in gleicher subinhibitorischer Konzentration (0,5x MHK und weniger) versetzt, weitere drei Kolben ohne Antibiotikum dienten als Kontrolle. Im Anschluss an eine weitere Inkubation von 70 min bei 37 °C unter Schütteln (130 upm) wurden die Ansätze auf Eis gestellt. Nach gleichmäßiger Suspendierung der Ansätze erfolgte zunächst die Bestimmung der $\text{OD}_{546\text{nm}}$. Anschließend wurden je 90 μl Probe entnommen und zu je 10 μl K_2HPO_4 -Puffer pipettiert. Nach guter Durchmischung wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

Zur Bestimmung der absoluten Luciferaseaktivität wurden die Proben aufgetaut, mit je 300 μl Lysis Mix (100 μl Lysozym-Lösung [5 mg/ml] und 200 μl CCLR [2x] + BSA [5 mg/ml]) versetzt, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Jeder Probe wurden jeweils drei Aliquots von 2,5 μl entnommen, in einer Mikrotiterplatte mit je 25 μl LAR

gemischt und direkt im Luminometer bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen. Während der Messung setzt die gebildete Luciferase das Substrat Luciferin in Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen zu Oxyluciferin und Licht (Biolumineszenz) um (*Abbildung 2.3*).

Abbildung 2.3: Funktionsweise des *precA-luc*-Reportergensystems



Aus den drei Biolumineszenz-Einzelmesswerten einer Probe wurde zunächst jeweils ein Mittelwert gebildet. Die spezifische Luciferaseaktivität wurde durch Division des Mittelwertes durch den OD_{546nm}-Wert der Kultur zum Zeitpunkt der Probenentnahme errechnet und dann als RLU/OD_{546nm} angegeben (s. Formel).

$$\text{spez. Luciferaseaktivität [RLU/OD}_{546\text{nm}}] = \frac{\bar{x} \text{ Biolumineszenzmess. einer Probe [RLU]}}{\text{OD}_{546\text{nm}} \text{ zum Zeitpunkt der Probenentnahme}}$$

Aus den so berechneten spezifischen Luciferaseaktivitäten von drei Parallelansätzen (mit gleicher Induktionskonzentration) eines Versuches wurde erneut ein Mittelwert gebildet und dieser um den Mittelwert der spezifischen Luciferaseaktivität der Fluorchinolone freien Kontrolle korrigiert.

In den hier beschriebenen Versuchen ist die spezifische Luciferaseaktivität gleichzusetzen mit der Höhe der *recA*-Induktion. Da *recA* in uninduzierten Zellen zu einem gewis-

sen Maß exprimiert wird (Grundwert der *recA*-Induktion) (328), ist eine Korrektur der induzierten Proben um den Mittelwert der uninduzierten Proben notwendig, um den tatsächlichen, nur durch das Chinolon verursachten Wert der *recA*-Genexpression bestimmen zu können.

Bei konstanten Inkubationsbedingungen sollte die Höhe der uninduzierten *recA*-Genexpression in allen Versuchsreihen nur geringe Schwankungen zeigen. Wurde der Grundwert der uninduzierten Zellen in einer Messreihe unterschritten, so mussten bakterielle Einflüsse angenommen werden und die Messung wurde nicht gewertet (383).

Die Streuung der Einzelmesswerte um einen Mittelwert wurde als absolute und relative Standardabweichung berechnet.

Berechnung der absoluten Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

Berechnung der relativen Standardabweichung:

$$s\% = \frac{s \times 100}{\bar{x}}$$

Die prozentuale Streuung um den jeweiligen Mittelwert von drei Proben betrug in allen Versuchen $\leq 10\%$ und wurde als Fehlerbereich toleriert.

Die MSIC eines Fluorchinolons wurde definiert als die Konzentration, die zu eine Erhöhung der spezifischen Luciferaseaktivität (nach Korrektur um die spezifischen Luciferaseaktivität der uninduzierten Kontrolle, s.o.) um mindestens 100 RLU/OD_{546nm} (Schwellenwert) im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle führte. Dieser Schwellenwert bezieht sich auf die Schwankungsbreite der spezifischen Luciferaseaktivitäten der drei (in allen Induktionsversuchen mitgeführten) uninduzierten Kontrollansätze.

2.2.2.12 Bestimmung der minimalen Cleavage-Konzentration (CC_{10}) von Fluorchinolonen für pro- und eukaryontische Typ II-Topoisomerasen

2.2.2.12.1 Cleavage-Assay mit Gyrase

Für den Gyrase Cleavage-Assay wurden $\frac{1}{5}$ des 5x Gyrase Inkubationspuffers, 6 U DNA Gyrase (in Dilutionspuffer), 0,15 μg relaxierte pBR322 DNA und verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Testchinolons (Pradofloxacin 0-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Enrofloxacin, Marbofloxacin, Danofloxacin, Orbifloxacin, Moxifloxacin, Ciprofloxacin, BayY3118, Gemifloxacin, Garenoxacin jeweils 0-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 30 μl aufgefüllt. Nach guter Durchmischung wurden die Ansätze für 60 min bei 25 °C inkubiert. Ohne Chinolonzugabe wurde relaxierte pBR322-DNA unter diesen Testbedingungen durch das Enzym vollständig überspiralisiert.

Alle Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS (Endkonzentration 1%) gestoppt. Durch Zusatz von EDTA (Endkonzentration 15 mM) und Proteinase K (Endkonzentration 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde die an der DNA verbliebene Topoisomerase während einer Inkubation von 30 min bei 37 °C entfernt, was zur Freisetzung von linearisierter DNA (Cleavage Produkt) führte. Die Proteinase K wurde anschließend durch Zugabe von Ladepuffer ($\frac{1}{10}$ Volumen) und einem 2 min Hitzeschritt (70 °C) inaktiviert.

Als Testkontrollen wurden relaxierte (Ausgangssubstrat) und *EcoRI* geschnittene, linearisierte pBR322 DNA, sowie ein Ansatz ohne Inhibitor und ein Ansatz mit Inhibitor, aber ohne Topoisomerase mitgeführt.

Die Proben wurden auf ein 0,7%iges Agarosegel geladen. Die Trennung der verschiedenen DNA-Topoisomere von der linearisierten DNA fand in 0,5x TBE-Puffer bei 2,5 V/cm für 16 h statt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 10 ng/ml) für 1 h im Dunkeln gefärbt und im Anschluss zur Entfernung der Hintergrundfärbung 30 min in Leitungswasser entfärbt. Danach wurden die Gele unter UV-Licht (302 nm) photographiert. Mit Hilfe eines Densitometers (UviProChemi) wurde die Intensität der Bande analysiert, die – pro Fluorchinolonzugabe – dem Cleavage-Produkt (linearisierte DNA) entsprach.

Die Bandenintensität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$V = \sum_{n_i} I_i$$

V = Bandenintensität [Volumeneinheiten]

n_i = Pixelanzahl / Bande

I_i = Intensität der Pixel / Bande

Die Intensität der Bande war proportional zur entstandenen Menge linearisierter DNA. Die Konzentration eines Fluorchinolons, die eine Zunahme des Cleavage-Produktes um 10 (\pm 3) Prozent im Vergleich zum Ausgangswert (Ansatz ohne Fluorchinolon) zur Folge hatte, wurde als minimale Cleavage-Konzentration bezeichnet (CC_{10}).

2.2.2.12.2 Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Für den Topoisomerase IV Cleavage-Assay wurden $1/10$ des 10x Topo IV Cleavage Puffers, 1 U Topoisomerase IV, 0,3 μ g überspiralisierte pBR322 DNA und verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Testchinolons (0-10 μ g/ml) mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 30 μ l aufgefüllt. Nach guter Durchmischung wurden die Ansätze für 45 min bei 37 °C inkubiert. Ohne Chinolonzugabe besitzt das Enzym unter diesen Testbedingungen die Fähigkeit, das überspiralisierte pBR322-Substrat vollständig zu relaxieren. Das Abstoppen der Reaktionsansätze und die Inaktivierung von Proteinase K erfolgte wie unter 2.2.2.12.1 beschrieben.

Als Testkontrollen wurden überspiralisierte (Ausgangssubstrat) und *EcoRI* geschnittene, linearisierte pBR322 DNA, sowie ein Ansatz ohne Inhibitor und ein Ansatz mit Inhibitor, aber ohne Topoisomerase mitgeführt.

Die Proben wurden auf ein 0,9%iges, 10 ng/ml Ethidiumbromid enthaltendes, Agarosegel geladen. Die Trennung der verschiedenen DNA-Topoisomere von der linearisierten DNA fand in 0,5x TBE Puffer bei 2,5 V/cm für 16 h statt. Die Auswertung erfolgte wie unter 2.2.2.12.1 beschrieben.

2.2.2.12.3 Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

12 U humane Topoisomerase II, $\frac{1}{10}$ des 10x Human Topo II Cleavage Puffers, 0,3 μg überspiralisierte pBR322 DNA und verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Testchinolons (Pradofloxacin, Gemifloxacin jeweils 0-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin, BayY3118, Garenoxacin jeweils 0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Marbofloxacin, Orbifloxacin, Danofloxacin jeweils 0-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 30 μl aufgefüllt. Nach guter Durchmischung wurden die Ansätze für 15 min bei 37 °C inkubiert. Ohne Chinolonzugabe besitzt das Enzym unter diesen Testbedingungen die Fähigkeit das überspiralisierte pBR322-Substrat vollständig zu relaxieren.

Das weitere Vorgehen sowie die Testkontrollen entsprachen dem unter Punkt **2.2.2.12.2.** beschriebenen.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Wirksamkeit von Fluorchinolonen auf zellulärer Ebene

3.1.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Fluorchinolonen gegenüber genetisch definierten Stämmen

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) vermittelt einen ersten Überblick über die antibakterielle Wirksamkeit und das Wirkungsspektrum einer neuen Substanz. Daher wurde die MHK von Pradofloxacin gegenüber ausgewählten Wildtypstämmen, Topoisomerasemutanten und hochresistenten Stämmen (mit genetisch definierten Mutationen in den Genen von Gyrase und Topoisomerase IV und der Regulatoren von Effluxpumpen sowie einer verminderten Porinbildung) von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* im Mikrobouillondilutionsverfahren (2.2.1.3) bestimmt. Als Vergleichssubstanzen dienten die in der Humanmedizin eingesetzten Fluorchinolone Cipro- und Moxifloxacin, sowie die veterinärmedizinisch relevanten Fluorchinolone Enro- und Marbofloxacin. Zusätzlich wurde BayY3118 mitgeführt. Diese Substanz gilt zur Zeit als aktivstes Fluorchinolon, ist jedoch auf Grund der in klinischen Prüfungen beobachteten Nebenwirkungen (z.B. Phototoxizität) zur Behandlung von Infektionen nicht zugelassen (42, 95).

Die Ergebnisse der MHK Bestimmungen sind in den **Tabellen 3.1** und **3.2** zusammengefasst. Die Auswertung der Ergebnisse wurde zunächst auf den Vergleich der MHK-Werte von Pradofloxacin mit denen der therapeutisch verwendeten Fluorchinolone beschränkt. Pradofloxacin zeigte gegenüber den getesteten Wildtypstämmen *E. coli* WT, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. intermedius* ATCC 29663 eine um 2 bis 8 Dilutionsschritte höhere Aktivität als die anderen Fluorchinolone. Die MHK-Werte für diese Substanz lagen im Bereich von 0,0156 bis 0,0625 µg/ml im Vergleich zu Enrofloxacin (0,03125 bis 0,125 µg/ml), Marbofloxacin (0,03125 bis 0,25 µg/ml), Ciprofloxacin (0,0156 bis 0,25 µg/ml) und Moxifloxacin (0,03125 bis 0,0625 µg/ml). Eine vergleichbar gute Aktivität besaßen alle getesteten Fluorchinolone gegenüber den *E. coli* Topoisomerasemutanten WT-2, WT-4 und WT-3-1 (**Tabelle 3.1**). Bezogen auf die Werte des Wildtypstammes *E. coli* WT bewirkte ein Austausch von Serin zu Isoleucin in der ParC-

Untereinheit von Topoisomerase IV (WT-4) keinen bzw. nur einen geringen Anstieg der MHK. Der Austausch einer Aminosäure in der GyrA-Untereinheit von Gyrase (WT-2) hatte hingegen bereits einen Anstieg der MHK-Werte um den Faktor 2 bis 8, der Austausch von 2 Aminosäuren in dieser Untereinheit (WT-3-1) sogar einen Anstieg um den Faktor 8 bis 16 zur Folge.

Tabelle 3.1: MHK-Werte gegenüber genetisch definierten *E. coli* Stämmen

Stamm	Mutationen	MHK [$\mu\text{g/ml}$]					
		Cip	Bay	Mox	Pra	Enr	Mar
WT	-----	0,0156	0,0156	0,0625	0,0156	0,03125	0,03125
WT-2	<i>gyrA</i> ^{S83L}	0,0625	0,125	0,125	0,0625	0,25	0,125/0,25
WT-4	<i>parC</i> ^{S80I}	0,0078	0,0156	0,03125	0,03125	0,0156	0,0156
WT-3-1	<i>gyrA</i> ^{S83L/D87G}	0,25	0,125	0,5	0,25	0,25	0,5
MII-M19	<i>gyrA</i> ^{S83L} <i>marR</i> Δ 175	2	0,5	4	1	8	8
MIII-300/16	<i>gyrA</i> ^{S83L/D87G} <i>parC</i> ^{S80I} <i>marR</i> Δ 74	8	1	8	2	8	4
4917-M-C1	<i>gyrA</i> ^{S83W/D87Y} <i>parC</i> ^{G78D} <i>marO</i> ::IS Δ <i>acrR</i>	8	0,25/0,5	4/8	1	16	16

Cip = Ciprofloxacin, Bay = BayY3118, Mox = Moxifloxacin, Pra = Pradofloxacin, Enr = Enrofloxacin, Mar = Marbofloxacin, Aminosäuresubstitutionen: S83L = Serin-83 \rightarrow Leucin, S80I = Serin-80 \rightarrow Isoleucin, D87G = Asparaginsäure-87 \rightarrow Glycin, S83W = Serin-83 \rightarrow Tryptophan, D87Y = Asparaginsäure-87 \rightarrow Tyrosin, G87D = Glycin-87 \rightarrow Asparaginsäure

Gegenüber hochresistenten *E. coli* Stämmen zeigte Pradofloxacin den besten Effekt. Die MHK-Werte dieser Substanz lagen bei den entsprechenden Mutanten (MII-M19, MIII-300/16, 4917-M-C1) im Bereich von 1 bis 2 $\mu\text{g/ml}$. Ciprofloxacin wies ebenfalls eine gute Wirkung gegenüber *E. coli* MII-M19 (2 $\mu\text{g/ml}$) auf, verlor jedoch an Aktivität gegenüber Mutanten, die mehr als eine zusätzliche Topoisomerasemutation besaßen (8 $\mu\text{g/ml}$). Moxi-, Enro- und Marbofloxacin zeigten gegenüber allen hochresistenten Stämmen im Vergleich zu Pradofloxacin deutlich geringere Aktivitäten, d.h. höhere MHK-Werte (4 bis 16 $\mu\text{g/ml}$).

Die MHK-Ergebnisse der untersuchten Fluorchinolone für die Topoisomerasemutante *S. aureus* Q48.1.2-1 (**Tabelle.3.2**) deuteten darauf hin, dass bereits ein einzelner Aminosäureaustausch in der GrlA-Untereinheit von Topoisomerase IV zu einer MHK-Erhöhung um den Faktor 4 bis 16 im Vergleich zum Wildtypstamm führt. Einen noch ausgeprägteren MHK-Anstieg (Faktor 32 bis 256) hatte der Austausch je einer Aminosäure in Gyrase und Topoisomerase IV in *S. aureus* Q24.2.5-3 zur Folge. Pradofloxacin und Moxifloxacin besaßen die geringsten MHK-Werte gegenüber Q48.1.2-1 (je 0,25 µg/ml) und Q24.2.5-3 (je 2 µg/ml).

Tabelle 3.2: MHK-Werte gegenüber genetisch definierten Staphylokokken Stämmen

Stamm	Mutationen	MHK [µg/ml]					
		Cip	Bay	Mox	Pra	Enr	Mar
<i>S. aureus</i>							
ATCC 6538	-----	0,25	0,0156	0,0625	0,0625	0,0625	0,125
Q48.1.2-1	<i>grlA</i> ^{E84K}	2	0,0625	0,25	0,25	1	2
Q24.2.5-3	<i>gyrA</i> ^{S84L} <i>grlA</i> ^{E84K}	64	0,5	2	2	16	16
<i>S. intermedius</i>							
ATCC 29663	-----	0,0625	0,0078	0,03125	0,03125	0,125	0,25

Cip = Ciprofloxacin, Bay = BayY3118, Mox = Moxifloxacin, Pra = Pradofloxacin, Enr = Enrofloxacin, Mar = Marbofloxacin, Aminosäuresubstitutionen: E84K = Glutaminsäure84 → Lysin, S84L = Serin84 → Leucin

Bei Vergleich der MHK-Werte aller getesteten Fluorchinolone gegenüber den Teststämmen stellte sich BayY3118 in fast allen Fällen (Ausnahme: *E. coli* WT-2 und WT-4) als wirksamste Substanz heraus. Die Werte von Pradofloxacin zeigten nur eine Abweichung um das Doppelte bis Vierfache von den Werten von BayY3118, während die Werte von Cipro-, Moxi-, Enro- und Marbofloxacin die MHK-Werte von BayY3118 um das 2- bis 128-fache überstiegen.

3.1.2 Selektion Fluorchinolon resistenter Mutanten

Mit dem vermehrten Einsatz von Fluorchinolonen in den letzten zwei Jahrzehnten in der Behandlung antibakterieller Infektionen wurde zunehmend auch das Auftreten Fluorchinolon resistenter Bakterien beobachtet (5). Die häufigsten Resistenzursachen stellten dabei Mutationen in den Genen von Gyrase und Topoisomerase IV dar. Es ist daher wichtig, neue Fluorchinolone auf ihre Fähigkeit zur Selektion resistenter Bakterien zu testen, um das Risiko einer unter Behandlung auftretenden bakteriellen Resistenz abschätzen zu können.

In Selektionsversuchen (2.2.1.9) mit Wildtypstämmen von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* wurde das Potential von Pradofloxacin zur Selektion resistenter Mutanten untersucht. Neben der Ermittlung der Mutationsfrequenz, wurde der Resistenzgenotyp (Sequenzierung) und der Resistenzphänotyp (MHK-Testung) bestimmt. Darüber hinaus sollten je nach Auftreten von Mutationen in Gyrase und/oder Topoisomerase IV Rückschlüsse auf die präferierte Zielstruktur von Pradofloxacin bei den untersuchten Species gezogen werden. Als Vergleichssubstanz wurde in Versuchen mit *E. coli* und *S. aureus* Enrofloxacin, in Versuchen mit *S. intermedius* Ciprofloxacin mitgeführt.

Die unter 3.1.1 in den **Tabellen 3.1** und **3.2** aufgeführten MHK-Werte für die Stämme *E. coli* WT, *S. aureus* ATCC 6538 und *S. intermedius* ATCC 29663 dienten zur Festlegung der Selektionskonzentrationen. In Versuchen mit *E. coli* und *S. aureus* wurde die 4- bis 64-fache MHK von Enro- und Pradofloxacin, in Versuchen mit *S. intermedius* die 4- bis 8-fache MHK von Cipro- und die 2- bis 8-fache MHK von Pradofloxacin als Selektionskonzentration eingesetzt.

Die Mutationsfrequenzen der selektierten *E. coli* und *Staphylococcus* Mutanten sind in den **Tabellen 3.3** und **3.4** aufgeführt. *E. coli* Mutanten wurden mit Enro- und Pradofloxacin bei Konzentrationen, die der 4- und 8-fachen MHK entsprachen, selektiert (**Tabelle 3.3**). Auf Selektionskonzentrationen, die der 16- bis 64-fachen MHK entsprachen, konnten keine Mutanten selektiert werden. Unter Verwendung der 4-fachen MHK (0,0625 µg/ml für Pradofloxacin und 0,125 µg/ml für Enrofloxacin) lag die Mutationsfrequenz für Enrofloxacin um ca. 1,5 Zehnerpotenzen niedriger als für Pradofloxacin, während die Mutationsfrequenzen bei der 8-fachen MHK annähernd gleiche Werte annehmen. Alle Selektionsversuche wurden nur einmal durchgeführt. Es besteht somit die

Möglichkeit, dass die Unterschiede in der Mutationsfrequenz zwischen Prado- und Enrofloxacin unter Verwendung der 4-fachen MHK als Selektionskonzentration eventuell auf methodische Schwankungen zurückzuführen sind.

Tabelle 3.3: Mutationsfrequenzen resistenter *E. coli* und *S. aureus* Mutanten

Wildtypstamm	Selektionskonzentration		Mutationsfrequenzen*		
	[µg/ml]	x-fache MHK		Enr	Pra
		Enr	Pra		
<i>E. coli</i> WT	0,0625	2	4	n.b.	$3,8 \times 10^{-9}$
	0,125	4	8	$9,4 \times 10^{-10}$	$1,2 \times 10^{-10}$
	0,25	8	16	1×10^{-10}	k.W.
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,25	4	4	n.b.	k.W.
	0,5	8	8	$8,3 \times 10^{-8}$	k.W.
	1	16	16	$2,5 \times 10^{-8}$	k.W.
	2	32	32	$1,8 \times 10^{-9}$	k.W.

* = nach 48 h Inkubation, Enr = Enrofloxacin, Pra = Pradofloxacin, n.b. = nicht bestimmt, k.W. = kein Wachstum nach 48 h und 7 d

Die Selektion von *S. aureus* Mutanten gelang nur mit Enrofloxacin bei Selektionskonzentrationen, die der 8- bis 32-fachen MHK entsprachen (**Tabelle 3.3**). Dabei nahmen die Mutationsfrequenzen ab der 32-fachen MHK (2 µg/ml) um eine Zehnerpotenz ab. Jedoch traten *S. aureus* Mutanten bei allen Selektionskonzentrationen mit einer erhöhten Rate im Vergleich zu den *E. coli* Mutanten auf.

Tabelle 3.4: Mutationsfrequenzen resistenter *S. intermedius* Mutanten

Wildtypstamm	Selektionskonzentration		Mutationsfrequenzen*		
	[µg/ml]	x-fache MHK		Cip	Pra
		Cip	Pra		
<i>S. intermedius</i> ATCC 29663	0,0625	1	2	n.b.	$3,9 \times 10^{-7}$
	0,125	2	4	n.b.	k.W.
	0,25	4	8	$3,2 \times 10^{-6}$	k.W.
	0,5	8	16	$3,2 \times 10^{-7}$	n.b.

* = nach 48 h Inkubation, Cip = Ciprofloxacin, Pra = Pradofloxacin, n.b. = nicht bestimmt, k.W. = kein Wachstum nach 48 h und 7 d

Verglichen mit den Ergebnissen von *S. aureus* und *E. coli* traten Mutationen in *S. intermedius* mit einer höheren Mutationsfrequenz ($3,2 \times 10^{-6}$ bis $3,9 \times 10^{-7}$) auf. Es ist jedoch insbesondere bei Pradofloxacin darauf hinzuweisen, dass Mutanten ausschließlich mit der 2-fachen MHK (0,0625 µg/ml) selektiert werden konnten, während die Selektion bei Enrofloxacin mit der 4- bis 8-fachen MHK gelang. Dabei lag die Mutationsfrequenz für Pradofloxacin ($3,9 \times 10^{-7}$) im Bereich derjenigen für Enrofloxacin unter Verwendung der 8-fachen MHK ($3,2 \times 10^{-7}$). Wurde die 4-fache MHK von Enrofloxacin zur Selektion eingesetzt, erhöhte sich die Möglichkeit für eine Mutation um eine Zehnerpotenz ($3,2 \times 10^{-6}$).

Im Anschluss an die Selektion wurden für jede Selektionskonzentration bis zu 24 Kolonien gepickt und auf neue Platten mit der entsprechenden Konzentration überimpft. Mutanten, die wiederum anwuchsen, wurden im Agardilutionstest (**2.2.1.9**) unter Verwendung verschiedener Antibiotika einer ersten Einteilung hinsichtlich der Empfindlichkeit unterzogen. Für die Agardilutionstestungen mit *E. coli* und *S. aureus* Mutanten wurden Prado- und Enrofloxacin, in Tests mit *S. intermedius* Prado- und Ciprofloxacin verwendet. Mutanten die unterschiedliche Empfindlichkeitsmuster für die jeweils eingesetzten beiden Antibiotika zeigten, wurden durch Sequenzierung weiter charakterisiert. Auf Grund der bevorzugten Lokalisation von Mutationen in der Chinolon-Resistenz-determinierenden-Region (QRDR) der Untereinheiten von Gyrase und Topoisomerase IV (363, 416) wurden für *E. coli* Mutanten diese Bereiche in *gyrA*, *gyrB* und *parC* sequenziert (**Tabelle 3.5**). *ParE* wurde nicht untersucht, da Mutationen in dieser Untereinheit nur in Einzelberichten beschrieben sind und erst in weiteren Selektionsschritten auftreten (94, 319). Für die Mutanten der Staphylokokken wurden die homologen QRDR-Bereiche von *gyrA* und *griA* untersucht (**Tabelle 3.5**).

In acht von neun sequenzierten *E. coli* Mutanten konnten Mutationen in der QRDR von *gyrA* (Ser83Leu, Asp87Asn) nachgewiesen werden. Die neunte Mutante – selektiert mit Pradofloxacin – besaß eine Mutation in *gyrB* (Ser464Tyr) außerhalb der QRDR (**Abbildung 3.1**).

Tabelle 3.5: Genotypische Charakterisierung ausgewählter Mutanten

Stamm bzw. Mutante	Selektionskonzentration			Mutationen
	Pra	Enr	Cip	
<i>E. coli</i> WT				o.M.
WT-F		0,125		<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}
WT-G / WT-H		0,125		<i>gyrA</i> ^{Asp87Asn}
WT-I / WT-J		0,25		<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}
WT-K	0,0625			<i>gyrB</i> ^{Ser464Tyr}
WT-L / WT-M	0,0625			<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}
WT-N	0,125			<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}
<i>S. aureus</i> ATCC 6538				o.M.
A / B		1		<i>grlA</i> ^{Ser80Phe}
C		0,5		<i>grlA</i> ^{Ser80Tyr}
D		0,5		<i>grlA</i> ^{Ser80Phe}
E		2		<i>grlA</i> ^{Ser80Phe}
<i>S. intermedius</i> ATCC 29663				o.M.
IC0,25-1d-1g			0,25	<i>grlA</i> ^{Asp84Asn}
IC0,25-1d-4 / -5g			0,25	<i>grlA</i> ^{Ser80Ile}
IC0,5-1d-22			0,5	<i>grlA</i> ^{Ser80Ile}
IC0,5-2d-41k			0,5	<i>grlA</i> ^{Asp84Asn}
IP0,06-2d-51	0,0625			<i>grlA</i> ^{Asp84Tyr}

o.M. = ohne Mutation, Enr = Enrofloxacin, Pra = Pradofloxacin, Cip = Ciprofloxacin, Aminosäuresubstitutionen: Ser83Leu = Serin-83 → Leucin, Asp87Asn = Asparaginsäure-87 → Asparagin, Ser464Tyr = Serin-464 → Tyrosin, Ser80Phe = Serin-80 → Phenylalanin, Ser80Tyr = Serin-80 → Tyrosin, Ser80Ile = Serin-80 → Isoleucin, Asp87Asn = Asparaginsäure-84 → Asparagin, Asp84Tyr = Asparaginsäure-84 → Tyrosin

Abbildung 3.1: Sequenzauszug des *gyrB*-Gens von *E. coli* WT und WT-K

460	464	470	
<i>Asp Lys Met Leu Ser Ser Gln Glu Val Ala Thr Leu</i>			
GAT AAG ATG CTC TCT TCT CAG GAA GTG GCG ACG CTT			<i>E. coli</i> WT
	↓		
.....A.....			<i>E. coli</i> WT-K
	<i>Tyr</i>		

Für die mit Enrofloxacin selektierten *S. aureus* Mutanten konnten ausschließlich Mutationen in der QRDR von *grlA* (Ser80Phe/Tyr) nachgewiesen werden. In sechs untersuchten *S. intermedius* Mutanten wurden nach der Sequenzierung Mutationen in der QRDR von *grlA* gefunden, dabei zeigten fünf mit Enrofloxacin selektierte Mutanten einen Aminosäureaustausch von Serin zu Isoleucin an Position 80 bzw. von Asparaginsäure zu Asparagin an Position 84. Die mit Pradofloxacin selektierte Mutante besaß ebenfalls einen Aminosäureaustausch an Position 84, jedoch wurde hier Asparaginsäure durch Tyrosin ersetzt. Da über Mutationen in *S. intermedius* nur wenig bekannt ist, kann darüber spekuliert werden, dass die aufgetretenen Mutationen in *grlA* vergleichbar mit den Hotspots 80 und 84 in *grlA* in *S. aureus* bzw. *parC* in *E. coli* sind.

Im Anschluss an die Sequenzierung wurde die MHK der Fluorchinolone Prado-, Enro-, Marbo-, Cipro- und Moxifloxacin bzw. BayY3118 gegenüber allen Topoisomerasemutanten bestimmt. Durch parallele MHK-Untersuchungen mit Multidrug-Resistance-Effluxpumpen Inhibitoren wurde getestet, ob ein gesteigerter Efflux (Austransport von Fluorchinolonen aus der Zelle) ebenfalls zur Resistenz der Mutanten beitrug. In Untersuchungen mit *E. coli* wurde zusätzlich zu den Fluorchinolonen Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid [32 μ g/ml] – ein Inhibitor für Multidrug-Resistance-Effluxpumpen (MDR) vom RND-Typ (z.B. AcrAB-TolC) – bzw. in Untersuchungen mit Staphylokokken der Inhibitor der NorA-Effluxpumpe Reserpin [20 μ g/ml] eingesetzt. Die Verwendung dieser Effluxpumpeninhibitoren hatte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die MHK-Werte (Daten nicht gezeigt) der *E. coli* bzw. *Staphylococcus* Mutanten. Die MHK-Werte mit Effluxinhibitoren lagen um höchstens eine MHK-Dilutionsstufe (Fehlerbereich der MHK-Bestimmung) niedriger als die MHK-Werte ohne Inhibitoren. In **Tabelle 3.6** sind daher nur die MHK-Daten ohne Zusatz von Effluxpumpeninhibitoren dargestellt.

Tabelle 3.6: Resistenzphänotyp der selektierten Mutanten

Stamm bzw. Mutante	Mutationen	MHK [$\mu\text{g/ml}$]					
		Cip	Bay	Mox	Pra	Enr	Mar
<i>E. coli</i>							
WT	o.M.	0,0156	0,0156	0,0625	0,0156	0,03125	0,03125
WT-F	<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}	0,125	0,0625	0,125	0,0625	0,25	0,5
WT-G	<i>gyrA</i> ^{Asp87Asn}	0,125	0,03125	0,125	0,0625	0,125	0,25
WT-H	<i>gyrA</i> ^{Asp87Asn}	0,125	0,03125	0,125	0,0625	0,125	0,25
WT-I	<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}	0,25	0,0625	0,25	0,0625	0,25	0,5
WT-J	<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}	0,125	0,0625	0,125	0,0625	0,25	0,5
WT-K	<i>gyrB</i> ^{Ser464Tyr}	0,0625	0,03125	0,0625	0,0625	0,125	0,125
WT-L	<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}	0,125	0,0625	0,125	0,0625	0,25	0,25
WT-M	<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}	0,125	0,0625	0,125	0,0625	0,25	0,5
WT-N	<i>gyrA</i> ^{Ser83Leu}	0,125	0,0625	0,125	0,0625	0,25	0,5
<i>S. aureus</i>							
ATCC 6538	o.M.	0,25	0,0156	0,0625	0,0625	0,0625	0,125
A	<i>grlA</i> ^{Ser80Phe}	1	0,03125	0,125	0,25	1	1
B	<i>grlA</i> ^{Ser80Phe}	1	0,03125	0,25	0,25	1	1
C	<i>grlA</i> ^{Ser80Tyr}	1	0,03125	0,25	0,25	1	1
D	<i>grlA</i> ^{Ser80Phe}	1	0,03125	0,25	0,25	1	1
E	<i>grlA</i> ^{Ser80Phe}	2	0,0625	0,25	0,25	1	4
<i>S. intermedius</i>							
ATCC 29663	o.M.	0,0625	0,0078	0,03125	0,03125	0,125	0,25
IC0,25-1d-1g	<i>grlA</i> ^{Asp84Asn}	0,25	0,0156	0,0625	0,0625	1	0,5
IC0,25-1d-4	<i>grlA</i> ^{Ser80Ile}	0,5	0,03125	0,125	0,0625	0,5	0,5
IC0,25-1d-5g	<i>grlA</i> ^{Ser80Ile}	0,5	0,03125	0,125	0,0625	1	0,5
IC0,5-1d-22	<i>grlA</i> ^{Ser80Ile}	0,5	0,03125	0,125	0,0625	0,5	0,5
IC0,5-2d-41k	<i>grlA</i> ^{Asp84Asn}	0,5	0,0156	0,0625	0,0625	0,5	0,5
IP0,06-2d-51	<i>grlA</i> ^{Asp84Tyr}	1	0,03125	0,125	0,0625	0,5	1

o.M. = ohne Mutation, Cip = Ciprofloxacin, Bay = BayY3118, Mox = Moxifloxacin, Pra = Pradofloxacin, Enr = Enrofloxacin, Mar = Marbofloxacin, Aminosäuresubstitutionen: Ser83Leu = Serin-83 → Leucin, Asp87Asn = Asparaginsäure-87 → Asparagin, Ser464Tyr = Serin-464 → Tyrosin, Ser80Phe = Serin-80 → Phenylalanin, Ser80Tyr = Serin-80 → Tyrosin, Ser80Ile = Serin-80 → Isoleucin, Asp84Asn = Asparaginsäure-84 → Asparagin, Asp84Tyr = Asparaginsäure-84 → Tyrosin

Die MHK-Bestimmung zeigte, dass ein Aminosäureaustausch in *E. coli* GyrA an den Positionen 83 oder 87 unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität der getesteten Fluorchinolone hatte. Während die MHK-Werte der Mutanten für Cipro-, Enro- und Marbofloxacin um das 4- bis 16-fache über den Werten des Ausgangsstammes lagen, stiegen die Werte von Prado- und Moxifloxacin, sowie BayY3118 nur um das 2- bis 4-fache an. Eine Mutation in *gyrB* (Ser464Tyr) hatte hingegen einen deutlich geringeren Effekt auf die MHK als eine Mutation in *gyrA*. Die MHK-Werte stiegen hierbei nicht (Moxifloxacin) bzw. nur geringfügig an (BayY3118 und Pradofloxacin 2-fach, Cipro-, Enro- und Marbofloxacin 4-fach).

Ein Aminosäureaustausch an Position 80 in den *grlA*-Mutanten von *S. aureus* wirkte sich ebenfalls unterschiedlich auf die MHK-Werte der getesteten Fluorchinolone aus. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Werte von Cipro-, Enro- und Marbofloxacin (4- bis 32-fach) im Vergleich zu den Werten des Ausgangsstammes ATCC 6538. Die MHK-Werte von BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin zeigten hingegen nur einen Anstieg um das 2- bis 4-fache. Durch Vergleich der MHK-Werte der Mutanten mit einem Aminosäureaustausch von Serin zu Phenylalanin an Position 80 fiel auf, dass die Werte der Mutante ATCC 6538-E für Ciprofloxacin (1 µg/ml), BayY3118 (0,0625 µg/ml) und Marbofloxacin (4 µg/ml) deutlich höher lagen als die Werte der Mutanten ATCC 6538-A, -B und -D. Auf Grund der Sequenzanalyse von *gyrA* konnten weitere Mutationen in der GyrA-Untereinheit ausgeschlossen werden.

Gegenüber den *S. intermedius* Mutanten zeigten Cipro- und Enrofloxacin einen deutlichen MHK-Anstieg (4- bis 16-fach). Die Werte für BayY3118, Marbo- und Moxifloxacin hingegen stiegen nur um das 2- bis 4-fache und die Werte von Pradofloxacin generell nur um das 2-fache im Vergleich zu den Werten des Ausgangsstammes ATCC 29663 an.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine einzelne Mutation in den meisten Fällen eine größere Auswirkung auf die Aktivität von Cipro-, Enro- und Marbofloxacin hatte. Die Fluorchinolone BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin besaßen hingegen eine sehr gute Aktivität auf alle selektierten Mutanten.

Zum Abschluss der Selektionsversuche wurden die Topoisomerasemutanten aller Species hinsichtlich der Stabilität ihrer Mutationen geprüft. Der Versuch mit Mutante

E. coli WT-K war dabei von vorrangigem Interesse auf Grund der Mutation außerhalb der QRDR von *gyrB*. Alle Mutanten wurden nach mehrfacher Passage in Antibiotikum freiem Medium wieder auf die ursprüngliche Selektionskonzentration ausplattiert (2.2.1.10). Eine Platte ohne Zusatz von Antibiotikum diente jeweils als Wachstumskontrolle.

Es zeigte sich, dass alle *E. coli* – auch Mutante WT-K – und *S. intermedius* Mutanten stabile Mutationen aufwiesen, da sie wieder auf ihren ursprünglichen Selektionskonzentrationen anwuchsen und ähnliche Keimzahlen – verglichen mit der Antibiotikum freien Kontrollplatte – aufwiesen. Die Keimzahlen von *E. coli* WT-K betragen beispielsweise $5,5 \times 10^{10}$ KBE/ml auf der Antibiotikum enthaltenden Platte und $4,8 \times 10^{10}$ KBE/ml auf der Kontrollplatte.

3.1.3 Bestimmung der bakteriziden Mechanismen von Fluorchinolonen mit Hilfe genetisch definierter Stämme

Die Bestimmung der MHK ist eine weit verbreitete Methode zur Ermittlung der Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber antibakteriell wirksamen Substanzen. Sie gibt jedoch nur die Hemmung der bakteriellen Zellteilung wieder und besagt weder etwas über die bakterizide Aktivität einer Substanz, noch deren Wirkung auf Bakterien in unterschiedlichen physiologischen Stadien. Dies kann allerdings eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Infektionen spielen, da im Patienten nicht nur teilungsaktive Zellen, sondern auch ruhende Zellen bzw. Zellen mit einem veränderten Metabolismus (Persister) vorkommen können. Die Wirkung von Pradofloxacin und weiterer Fluorchinolone wurde daher auf Zellen von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* in verschiedenen physiologischen Stadien mit Hilfe von Absterbekinetiken (s. 3.1.3.2) untersucht.

3.1.3.1 Ermittlung der optimalen bakteriziden Konzentration

Fluorchinolon behandelte Zellen zeigen im Vergleich zu Zellen, die mit anderen antimikrobiell wirksamen Substanzen behandelt wurden, ein von der Konzentration abhän-

giges biphasisches Absterbeverhalten (201). Dies bedeutet, dass sich die bakterizide Aktivität eines Chinolons bis zu einer bestimmten Konzentration steigert. Darüber hinaus wird die Wirkung abgeschwächt. Die Konzentration, die das maximale Absterben der Zellen zur Folge hat, wird als optimale bakterizide Konzentration (OBC) bezeichnet (252). Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass diese Konzentration experimentellen Charakter besitzt und nicht zur Behandlung von Infektionen eingesetzt werden kann. Sie kann höchstens als Richtwert für die Beurteilung auf Eignung einer Substanz für eine antibakterielle Chemotherapie angesehen werden. Konzentrationen von Antibiotika für die Behandlung von Infektionen liegen im Patienten ein Vielfaches über der OBC, da in vivo weitere Effekte bei der Dosierung eine Rolle spielen, wie z.B. die Pharmakokinetik (Absorption, Distribution, Elimination, Halbwertszeit) einer Substanz. Verwendung findet die OBC in Versuchen zur Bestimmung bakterizider Mechanismen von Chinolonen, da durch diese Konzentration ein ausgeprägterer bakterizider Effekt hervorgerufen wird als bei der Verwendung einer geringeren Konzentration, wie z.B. der MHK.

In der vorliegenden Arbeit wurde die OBC von BayY3118, Prado-, Enro-, Marbo-, Moxi- und Ciprofloxacin für Wildtypstämme und Topoisomerasemutanten von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* mit Hilfe der unter **2.2.1.5** beschriebenen Methode bestimmt. Die ermittelten OBC-Werte sind in den **Tabellen 3.7** und **3.8** zusammengefasst.

Tabelle 3.7: OBC-Werte verschiedener Fluorchinolone gegenüber *E. coli* WT und den isogenen Mutanten WT-4 und WT-3-1

Chinolon \ Stamm	OBC [$\mu\text{g/ml}$] / (x-fache MHK)		
	WT	WT-4	WT-3-1
Ciprofloxacin	0,25 (16)	0,125 (16)	16 (64)
BayY3118	0,125 (8)	0,25 (16)	8 (64)
Moxifloxacin	4 (64)	1 (32)	64 (128)
Pradofloxacin	1 (64)	0,5 (16)	4 (16)
Marbofloxacin	0,5 (16)	2 (128)	64 (256)
Enrofloxacin	0,5 (16)	1 (64)	64 (128)

Die für die *E. coli* Stämme WT, WT-4 (Topoisomerase IV Mutante) und WT-3-1 (Gyrase Mutante) bestimmten OBC-Werte übersteigen die entsprechenden MHK-Werte der Stämme (**Tabelle 3.7**) um ein Vielfaches (8- bis 256-fache MHK). Vergleicht man die OBC-Werte der Fluorchinolone untereinander, so besitzt Pradofloxacin sowohl gegenüber dem Wildtyp von *E. coli* als auch gegenüber der Topoisomerase IV Mutante WT-4 bzw. der Gyrase Mutante WT-3-1 geringere Werte. Bei der Betrachtung der OBC-Werte aller Substanzen gegenüber *E. coli* WT weisen alle Substanzen bis auf Moxifloxacin (4 µg/ml) OBC-Werte unterhalb einer Konzentration von 2 mg/ml auf. Gegenüber der *parC* Mutante WT-4 wurde diese Konzentration von keinem Fluorchinolon überschritten. Eine Doppelmutation in der GyrA-Untereinheit (WT-3-1) bewirkte bei allen Fluorchinolonen, außer Pradofloxacin (4-fach), einen deutlichen Anstieg der OBC (16- bis 128-fach) im Vergleich zum Wildtyp.

Tabelle 3.8: OBC-Werte verschiedener Fluorchinolone gegenüber den Wildtypstämmen *S. aureus* und *S. intermedius* bzw. den isogenen Mutanten Q48.1.2-1 und Q24.2.5-3

Chinolon \ Stamm	OBC [µg/ml] / (x-fache MHK)			
	ATCC 6538	<i>S. aureus</i> Q48.1.2-1	Q24.2.5-3	<i>S. intermedius</i> ATCC 29663
Ciprofloxacin	2 (8)	16 (8)	n.b.	2 (32)
BayY3118	0,25 (16)	2 (32)	64 (128)	1 (128)
Moxifloxacin	4 (64)	16 (64)	128 (64)	2 (64)
Pradofloxacin	1 (16)	16 (64)	128 (64)	2 (64)
Enrofloxacin	1 (16)	8 (8)	512 (32)	32 (256)
Marbofloxacin	2 (16)	16 (8)	256 (16)	16 (64)

n.b. = nicht bestimmt, da Substanz bei Konzentrationen über der 32-fachen MHK ausfiel

Entsprechend den Ergebnissen mit *E. coli* überstiegen auch die OBC-Werte der getesteten Staphylokokken (**Tabelle 3.8**) die entsprechenden MHK-Werte um das 8- bis 256-fache. Mutationen in *S. aureus* Topoisomerase IV und Gyrase bewirkten bei allen Fluorchinolonen eine deutliche Erhöhung der OBC-Werte im Vergleich zu den Werten des Wildtypstammes.

In den nachfolgenden Versuchen zur Ermittlung der bakteriziden Aktivität der Chinolone anhand von Absterbekinetiken wurden die Antibiotika in der zuvor ermittelten OBC eingesetzt. Eine Absterbekinetik mit *S. aureus* Q24.2.5-3 und Ciprofloxacin konnte nicht durchgeführt werden, da die OBC nicht bestimmbar war (**Tabelle 3.8**).

3.1.3.2 Absterbekinetiken

Chinolone können vier unterschiedliche bakterizide Mechanismen aufweisen – A, B, B₁ und C (252, 253). Mechanismus A zeigen alle Chinolone, d.h. auch ältere, unfluorierte Vertreter, wie z.B. Nalidixinsäure (346). Voraussetzung für die Wirksamkeit dieses Mechanismus ist neben einer aktiven Zellteilung von Bakterien auch eine aktive Proteinbiosynthese. Neuere Chinolone wie die Fluorchinolone können darüber hinaus zusätzliche Mechanismen besitzen. Z.B. zeigt Ofloxacin neben Mechanismus A auch den Mechanismus B, der gekennzeichnet ist durch eine bakterizide Wirkung auf ruhende Zellen und Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese (202). Mechanismus B kann in die zwei Subtypen B₁ und C unterteilt werden. Fluorchinolone, die zwar gegen Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese, nicht aber gegen teilungsinaktive Zellen wirksam sind, besitzen Mechanismus B₁ und im umgekehrten Falle Mechanismus C (251). Der Nachweis der bakteriziden Mechanismen beruht auf der Abnahme der Lebendzellzahl um 99,9% nach dreistündiger Inkubation mit einem Fluorchinolon in verschiedenen Medien (s. **2.2.1.6**). Erfolgt eine Keimzahlreduktion in NI-Bouillon (aktive Zellteilung und Proteinbiosynthese), so kann auf Mechanismus A geschlossen werden. Ein bakterizider Effekt in phosphatgepufferten Kochsalzlösungen – PBS unterbindet die Zellteilung durch Nährstoffmangel – und in NI-Bouillon mit Zusatz von Chloramphenicol [50 µg/ml] (zur Hemmung der Proteinbiosynthese) kennzeichnet Mechanismus B. Ist eine bakterizide Wirkung nur in PBS bzw. NI-Bouillon mit Chloramphenicol erkennbar, weist dies auf die Mechanismen C bzw. B₁ hin.

Das Vorliegen mehrerer bakterizider Mechanismen zusätzlich zu Mechanismus A – vor allem von Mechanismus B – gilt als Vorteil für ein Fluorchinolon, da somit Bakterien in verschiedenen physiologischen Stadien abgetötet werden können. Daher wurde untersucht, welche bakteriziden Mechanismen Pradofloxacin im Vergleich zu den Fluorchi-

nolonen BayY3118, Cipro-, Moxi-, Enro- und Marbofloxacin auf Bakterien in verschiedenen physiologischen Stadien besitzt. Des Weiteren sollte mit Hilfe von definierten Mutanten geprüft werden, ob Mutationen in Gyrase und/oder Topoisomerase IV einen Einfluss auf die Expression eines Mechanismus haben. Die Fluorchinolone wurden jeweils in ihrer optimalen bakteriziden Konzentration eingesetzt. Eine Reduktion der Lebendkeimzahl um ≥ 3 ($\pm 0,3$) Zehnerpotenzen galt als Nachweis für einen Mechanismus.

Abbildung 3.2: Bakterizide Mechanismen gegenüber *E. coli* WT

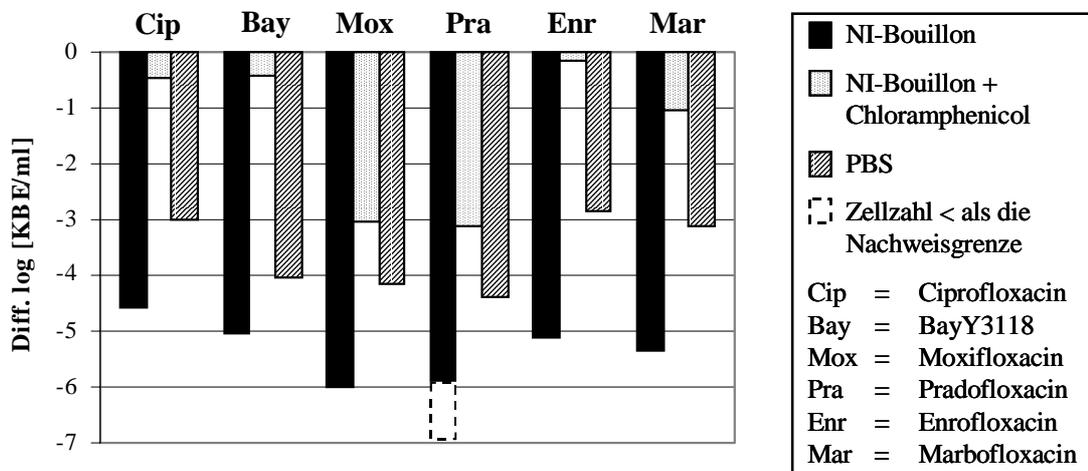


Abbildung 3.3: Bakterizide Mechanismen gegenüber *E. coli* WT-4

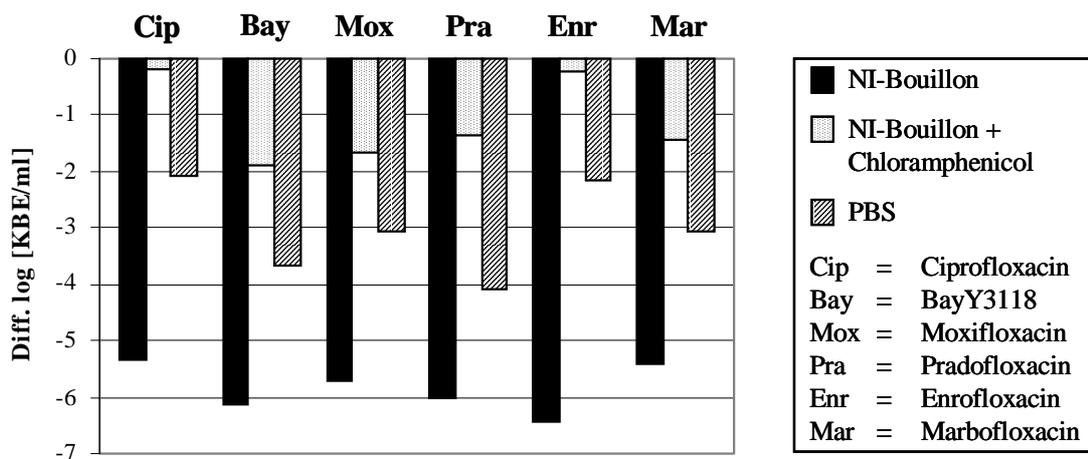
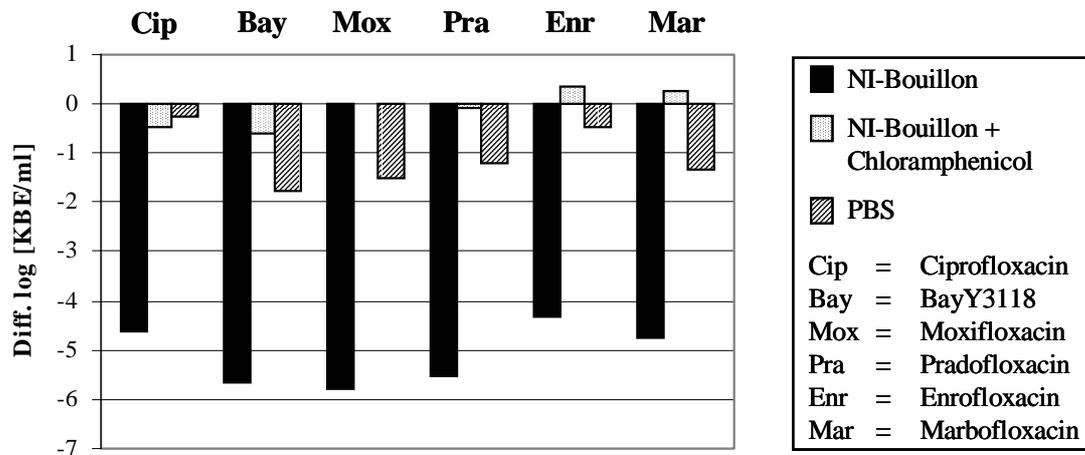


Abbildung 3.4: Bakterizide Mechanismen gegenüber *E. coli* WT-3-1



Die **Abbildungen 3.2 bis 3.4** zeigen die durch die untersuchten Fluorchinolone innerhalb von 3 h hervorgerufene Keimzahlreduktion von *E. coli* WT und dessen isogenen Mutanten WT-4 und WT-3-1. Alle Fluorchinolone reduzierten in NI-Bouillon die Keimzahl von *E. coli* WT um mehr als 3 Zehnerpotenzen. Die höchste Keimzahlreduktion wurde dabei mit Pradofloxacin erzielt. Es reduzierte die Keimzahl um mehr als 5,86 Zehnerpotenzen. Der genaue Wert konnte nach 3 h nicht ermittelt werden, da die Keimzahl bereits unter der Nachweisgrenze lag.

Ein bakterizider Effekt auf ruhende Zellen und Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese konnte nur für Pradofloxacin und Moxifloxacin gegenüber *E. coli* WT nachgewiesen werden. Die Substanzen reduzierten die Zellzahl dabei in PBS um 4,37 bzw. 4,13 Zehnerpotenzen, in NI-Bouillon mit Chloramphenicolzusatz um 3,15 bzw. 3,06 Zehnerpotenzen (**Abbildung 3.2**). Für die übrigen Fluorchinolone konnte eine Zellzahlreduktion in PBS nachgewiesen werden, aber nicht in NI-Bouillon mit Chloramphenicolzusatz. Letzteres wird durch die geringe Keimzahlreduktion verdeutlicht (-0,14 bis -1,05 Zehnerpotenzen).

Eine einzelne Mutation in der ParC-Untereinheit von Topoisomerase IV (WT-4) hatte für Ciprofloxacin einen Rückgang der Keimzahlreduktion in PBS und für Moxi- und Pradofloxacin in NI-Bouillon mit Chloramphenicolzusatz zur Folge. Moxi- und Pradofloxacin zeigten sich jedoch weiterhin aktiv gegenüber ruhenden Zellen (**Abbildung 3.3**). Gegenüber WT-3-1 mit einer doppelten Mutation in der GyrA-Untereinheit von Gyrase konnte für alle Fluorchinolone nur noch in NI-Bouillon eine Keimzahlreduktion von über 3 Zehnerpotenzen beobachtet werden (**Abbildung 3.4**).

Abbildung 3.5: Bakterizide Mechanismen gegenüber *S. intermedius* ATCC 29663

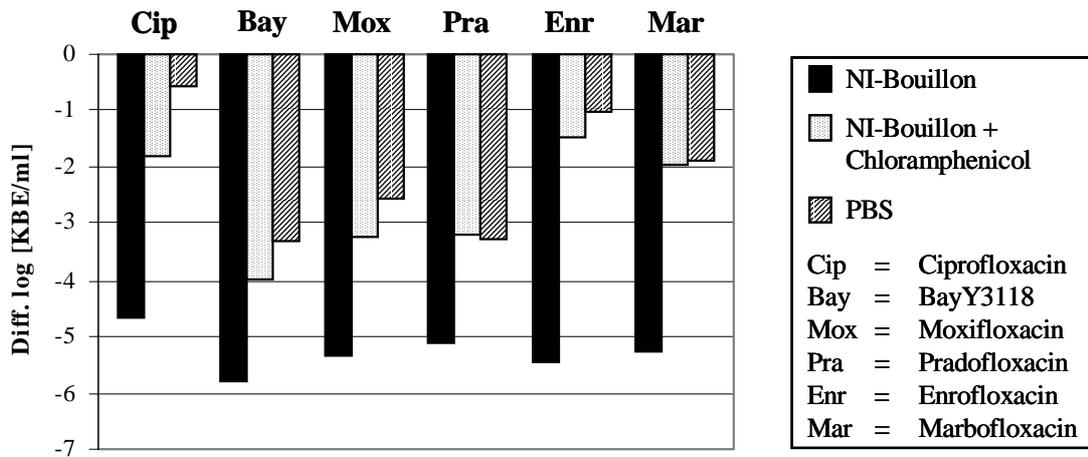


Abbildung 3.5 kann entnommen werden, dass alle Fluorchinolone in NI-Bouillon die Keimzahl von *S. intermedius* um mehr als 4 Zehnerpotenzen reduzierten. Darüber hinaus waren nur BayY3118 bzw. Pradofloxacin zu einer Keimzahlreduktion von über 3 Zehnerpotenzen in PBS und NI-Bouillon mit Chloramphenicolzusatz befähigt. Eine entsprechende Reduktion der Zellzahl konnte mit Moxifloxacin nur in NI-Bouillon mit Chloramphenicolzusatz ($-3,25$ Zehnerpotenzen) und nicht in PBS ($-2,57$ Zehnerpotenzen) beobachtet werden.

Abbildung 3.6: Bakterizide Mechanismen gegenüber *S. aureus* ATCC 6538

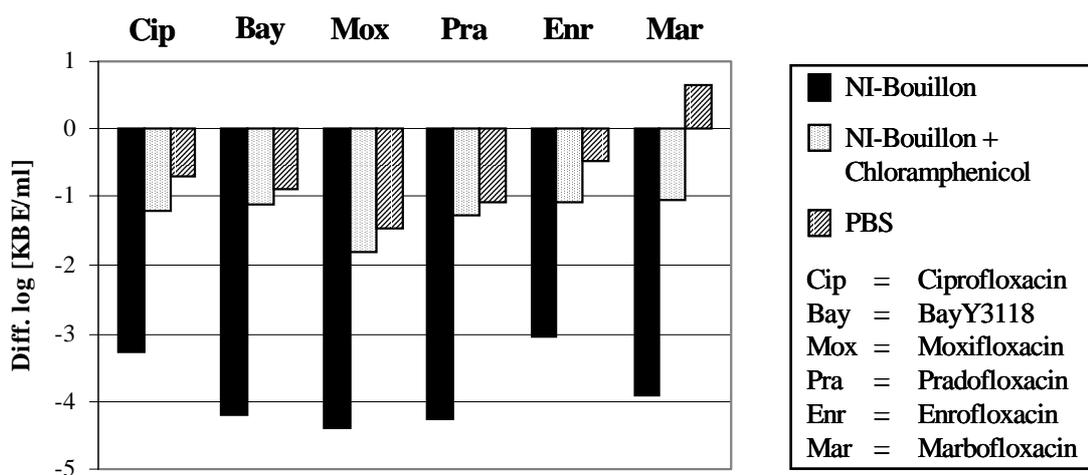


Abbildung 3.7: Bakterizide Mechanismen gegenüber *S. aureus* Q48.1.2-1

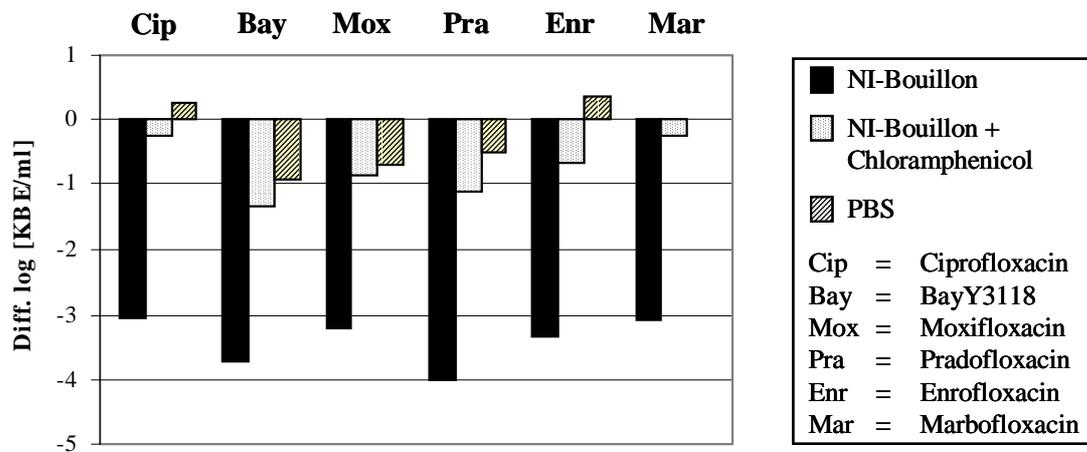
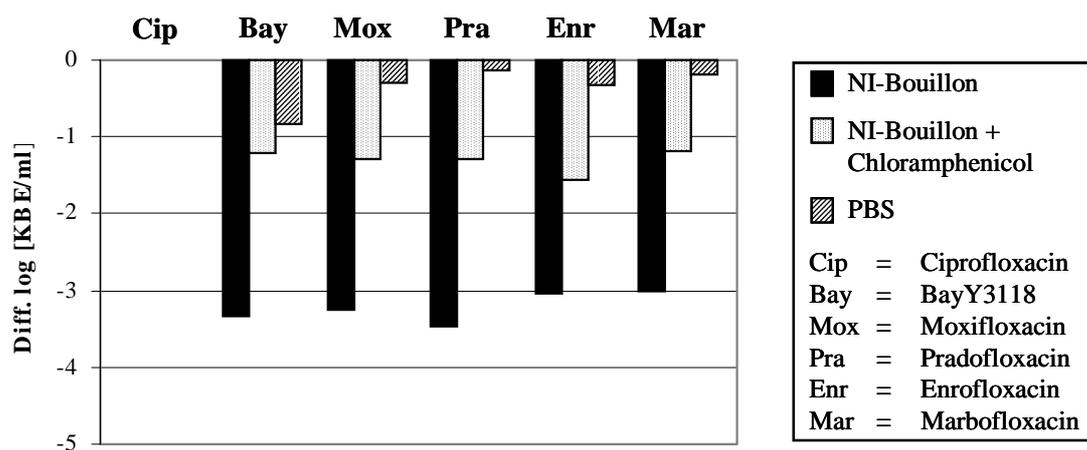


Abbildung 3.8: Bakterizide Mechanismen gegenüber *S. aureus* Q24.2.5-3



Unter Einbezug der Definition für einen Mechanismus, der Keimzahlreduktion um 99,9% innerhalb von 3 h, konnte für alle getesteten Fluorchinolone eine Keimzahlreduktion der *S. aureus* Stämme von über 3 Zehnerpotenzen nur in NI-Bouillon beobachtet werden (**Abbildungen 3.6 bis 3.8**). Wurde eine Keimzahlreduktion von 90% (entspricht einer log Stufe) angesetzt, konnten Unterschiede in den Wirkungsweisen der Fluorchinolone nachgewiesen werden. So zeigten Cipro-, Enro- und Marbofloxacin eine Aktivität gegenüber Zellen von *S. aureus* ATCC 6538 in NI-Bouillon mit Chloramphenicolzusatz (-1,22, -1,08 bzw. -1,05 Zehnerpotenzen), aber nicht in PBS (-0,69, -0,46 bzw. 0,64). BayY3118, Prado- und Moxifloxacin zeigten hingegen einen bakteriziden Effekt (**Abbildung 3.6**) in beiden Medien. Eine Mutation in Topoisomerase IV (Mutante Q48.1.2-1) führte – wie bereits bei *E. coli* WT-4 beobachtet – zu einer verringerten

Keimzahlreduktion. So konnte für Cipro- und Marbofloxacin nur noch ein bakterizider Effekt in NI-Bouillon nachgewiesen werden. Moxi- und Pradofloxacin verloren ihre Wirksamkeit auf ruhende Zellen, zeigten sich jedoch weiterhin aktiv gegenüber Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese (**Abbildung 3.7**). BayY3118 war als einziges Fluorchinolone weiterhin aktiv in NI-Bouillon mit Chloramphenicolzusatz und PBS (Keimzahlreduktion um $-1,35$ bzw. $-0,92$ Zehnerpotenzen). Das Vorhandensein von Mutationen in Gyrase und Topoisomerase IV (Mutante Q24.2.5-3) bewirkte keine wesentliche Änderung der bakteriziden Aktivität der Fluorchinolone in den unterschiedlichen Medien (**Abbildung 3.8**). Die Wirkungsweise von Ciprofloxacin auf Mutante Q24.2.5-3 konnte nicht bestimmt werden, da zuvor kein OBC-Wert für diese Substanz ermittelt werden konnte (s. **3.1.3.1**).

Die oben beschriebenen Absterbekinetiken zeigten die bakterizide Wirkung der getesteten Fluorchinolone in verschiedenen Medien unter Verwendung ihrer optimalen bakteriziden Konzentration. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, ob – und wenn ja in welcher Weise – sich der Wirkungstyp bei Einsatz geringerer Konzentrationen als der OBC verändert. Zum Vergleich der Fluorchinolone untereinander wurde dafür die 8-fache MHK jeder Substanz in Absterbekinetiken mit den oben bereits beschriebenen *E. coli* Stämmen eingesetzt, da diese Konzentration näher an klinisch relevanten Konzentrationen wie z.B. der maximalen Serumkonzentration liegt als die optimale bakterizide Konzentration.

Abbildung 3.9: Bakterizide Mechanismen gegenüber *E. coli* WT (8x MHK)

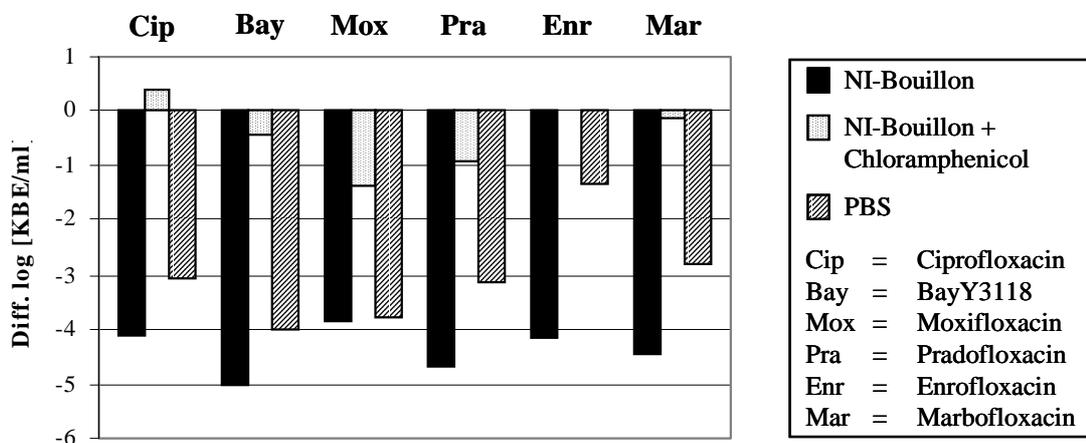


Abbildung 3.10: Bakterizide Mechanismen gegenüber *E. coli* WT-4 (8x MHK)

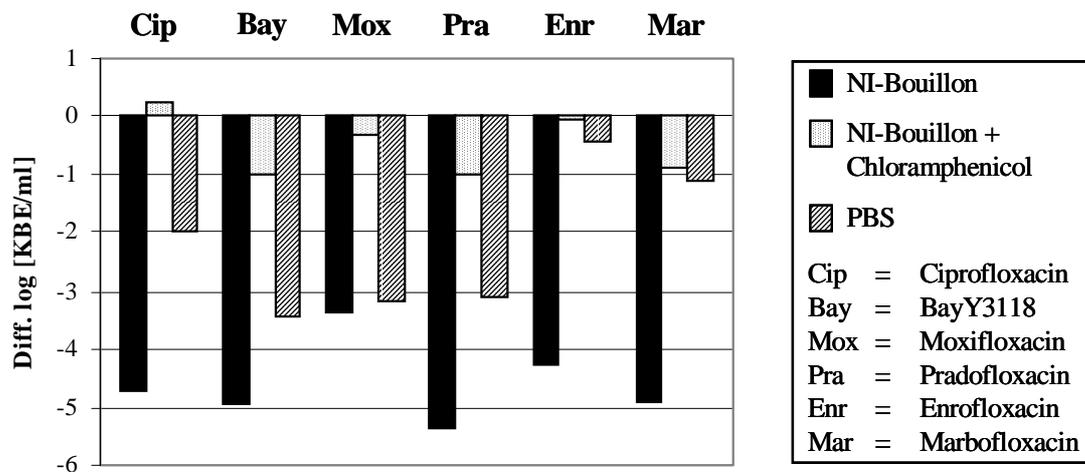
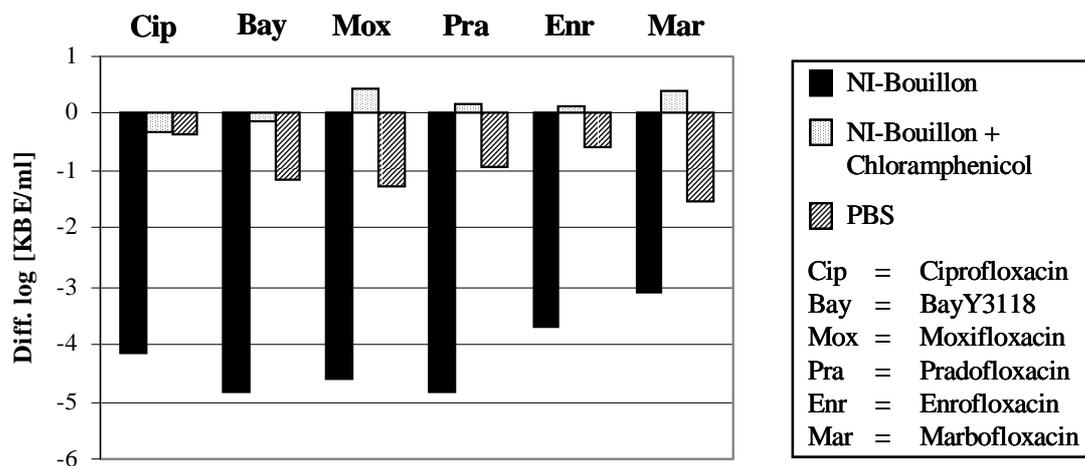


Abbildung 3.11: Bakterizide Mechanismen gegenüber *E. coli* WT-3-1 (8x MHK)



Bei der 8-fachen MHK zeigten alle Fluorchinolone in NI-Bouillon nach wie vor eine Reduktion der Keimzahl der getesteten *E. coli* Stämmen von über 3 Zehnerpotenzen (Abbildungen 3.9 bis 3.11). Auffällig war jedoch, dass bei dieser Konzentration – im Gegensatz zur Verwendung der OBC – Moxi- und Pradofloxacin nicht länger gegenüber Zellen von *E. coli* WT mit inaktiver Proteinbiosynthese wirksam waren (Keimzahlreduktion $-1,37$ bzw. $-0,92$). Beide Fluorchinolone zeigten sich aber weiterhin aktiv gegenüber ruhenden Zellen (vergl. Abbildung 3.9 mit 3.2). Moxifloxacin reduzierte die Keimzahl von *E. coli* WT in PBS um 3,78, Pradofloxacin um 3,13 Zehnerpotenzen. Die Verringerung der eingesetzten Konzentration auf die 8-fache MHK hatte für Enrofloxacin den Verlust der Wirkung in PBS zu Folge, jedoch nicht in NI-Bouillon mit Chloramphenicolzusatz.

Für die Wirkungsweise der Fluorchinolone auf die beiden Topoisomerasemutanten konnte unter Einsatz der 8-fachen MHK – wie in den Versuchen mit der OBC – gezeigt werden, dass Mutationen in den verschiedenen Topoisomerase-Untereinheiten zum Verlust der bakteriziden Wirkung auf Bakterien in unterschiedlichen physiologischen Stadien führten. Eine Mutation in Topoisomerase IV hatte beispielsweise bei Moxi- und Pradofloxacin den Verlust der Wirkung auf Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese, eine Doppelmutation in Gyrase zusätzlich den Verlust der Wirkung auf ruhende Zellen zur Folge.

Tabelle 3.9: Bakterizide Mechanismen verschiedener Fluorchinolone bei Verwendung der OBC bzw. 8-fachen MHK

Stamm	Bakterizide Mechanismen bei OBC (8-facher MHK)					
	Cip	Bay	Mox	Pra	Enr	Mar
<i>E. coli</i>						
WT	A, C (A, C)	A, C (A, C)	A, B (A, C)	A, B (A, C)	A, C (A)	A, C (A, C)
WT-4	A (A)	A, C (A, C)	A, C (A, C)	A, C (A, C)	A (A)	A, C (A)
WT-3-1	A (A)	A (A)	A (A)	A (A)	A (A)	A (A)
<i>S. aureus</i>						
ATCC 6538	A, B ₁	A, B	A, B	A, B	A, B ₁	A, B ₁
Q48.1.2-1	A	A, B	A, B ₁	A, B ₁	A, B ₁	A
Q24.2.5-3	n.b.	A, B	A, B ₁	A, B ₁	A, B ₁	A, B ₁
<i>S. intermedius</i>						
ATCC 29663	A	A, B	A, B ₁	A, B	A	A

n.b. = nicht bestimmt, Cip = Ciprofloxacin, Bay = BayY3118, Mox = Moxifloxacin, Pra = Pradofloxacin, Enr = Enrofloxacin, Mar = Marbofloxacin, A = bakterizider Effekt gegenüber wachsenden Zellen mit aktiver Proteinbiosynthese (Mechanismus A), B = bakterizider Effekt gegenüber teilungsinaktiven Zellen und Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese (Mechanismus B), B₁ = bakterizider Effekt gegenüber wachsenden Zellen und Zellen mit inaktiver Proteinbiosynthese (Mechanismus B₁), C = bakterizider Effekt gegenüber teilungsinaktiven Zellen und Zellen mit aktiver Proteinbiosynthese (Mechanismus C)

In **Tabelle 3.9** sind die Ergebnisse aller Absterbekinetiken zusammengefasst. Daraus kann entnommen werden, dass nicht alle Fluorchinolone gleichermaßen auf Bakterien in verschiedenen physiologischen Stadien wirken. Darüber hinaus werden die getesteten Fluorchinolone unterschiedlich stark in ihrer Wirkungsweise durch verschiedene Mutationen beeinträchtigt.

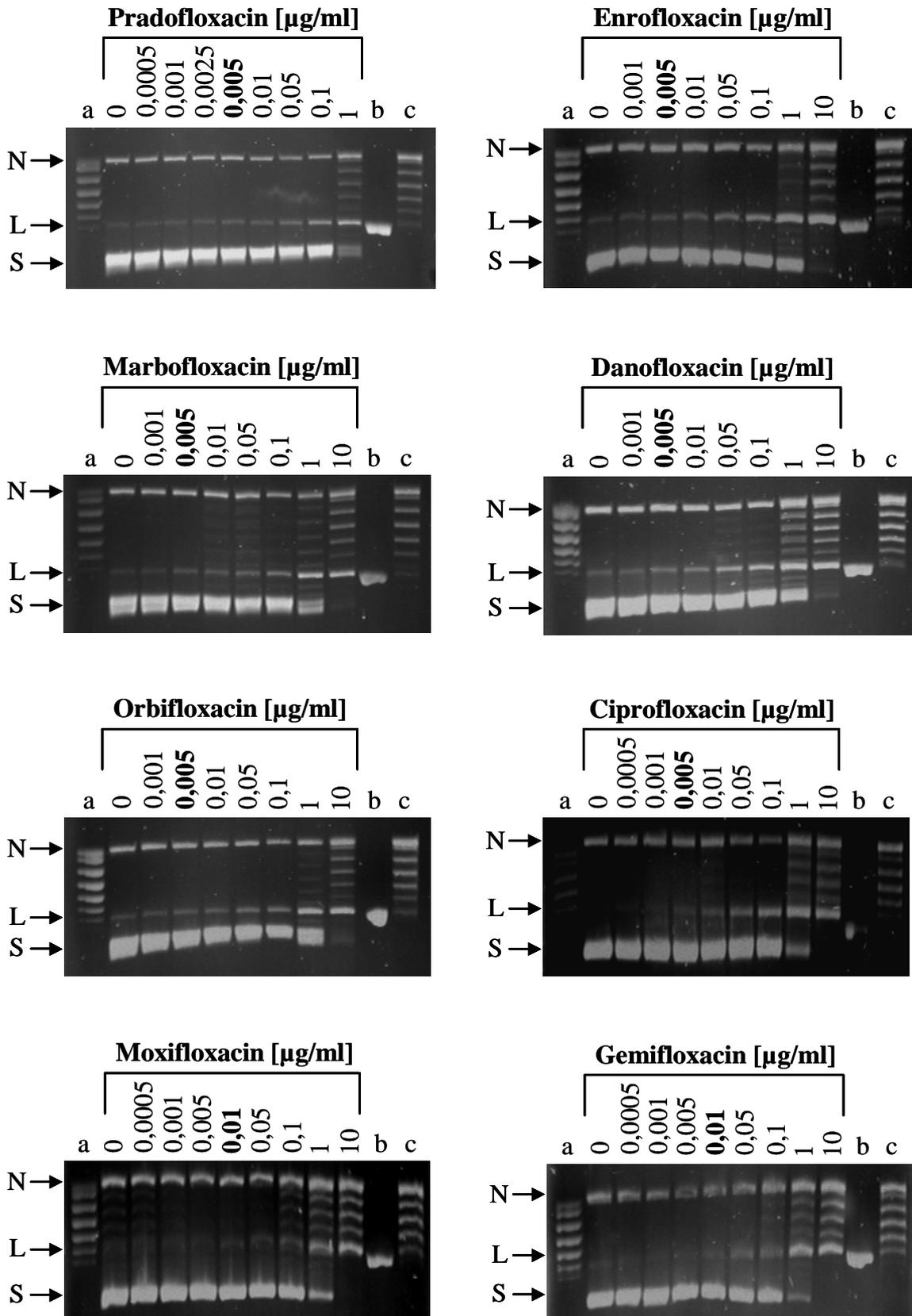
3.2 Bestimmung der Wirksamkeit von Fluorchinolonen auf molekularer Ebene

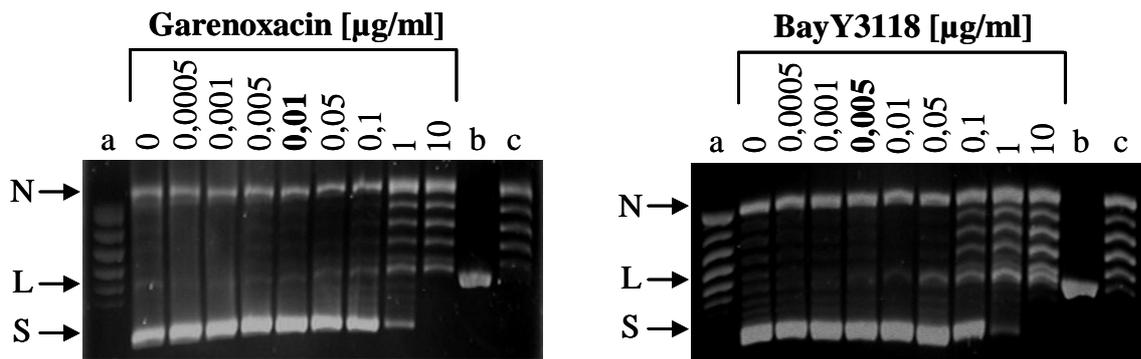
3.2.1 Wirkung von Fluorchinolonen auf isolierte Zielstrukturen

Die Inhibierung von Gyrase und Topoisomerase IV durch die Formierung stabiler ternärer Komplexe aus Chinolon, Enzym und DNA (Cleavage-Komplex) ist ein wesentliches Ereignis für die bakterizide Chinolon-Wirkung. Durch die Bindung des Chinolons wird die Fähigkeit der Typ II Topoisomerasen, doppelsträngige DNA zu spalten, nicht behindert, wohl aber die normalerweise im Reaktionszyklus folgende Religation des Doppelstrangbruchs (283). Da funktionsfähige Typ II-Topoisomerasen essentiell für die Zelle bzw. für deren Wachstum sind, genügt theoretisch ein einzelner ternärer Komplex, um die Zelle zu schädigen und den Zelltod zu verursachen (176). Folglich hängt die Aktivität eines Chinolons von der frühzeitigen Stabilisierung von Typ II-Topoisomerase-DNA-Komplexen ab.

In DNA-Cleavage-Assays mit isolierten Zielstrukturen von *E. coli* (Gyrase und Topoisomerase IV) wurde die minimale effektive Konzentration zur Generierung eines DNA-Doppelstrangbruchs für Pradofloxacin ermittelt. Zusätzlich sollten mit Hilfe der Untersuchungen weitere Aussagen zur bevorzugten Zielstruktur von Pradofloxacin getroffen werden. Als Vergleichssubstanzen wurden die veterinärmedizinisch relevanten Fluorchinolone Enro-, Marbo-, Orbi- und Danofloxacin, die humanmedizinisch verwendeten Fluorchinolone Cipro- und Moxifloxacin, sowie Gemifloxacin, Garenoxacin und BayY3118 in die Untersuchungen miteinbezogen. Als Substrat für Gyrase bzw. Topoisomerase IV wurde relaxierte bzw. überspiralisierte Plasmid-DNA (pBR322) verwendet. Die Cleavage-Reaktionen wurden nach in dieser Arbeit entwickelten Standardprotokollen durchgeführt (2.2.2.12.1 und 2.2.2.12.2). Die Auftrennung der Cleavage-Proben erfolgte anhand von Agarosegelen (**Abbildungen 3.12** und **3.13**). Mit Hilfe eines Densitometers wurde die Intensität der Bande analysiert, die – pro Fluorchinolonzentration – dem Cleavage-Produkt (linearisierte DNA) entsprach (**7.1, Tabellen 7.1 bis 7.10** und **7.2, Tabellen 7.11 bis 7.20**). Die Konzentration eines Fluorchinolons, die eine Zunahme des Cleavage-Produkts um 10 (± 3) Prozent im Vergleich zur Antibiotikum freien Kontrolle zur Folge hatte, wurde als minimale Cleavage-Konzentration bezeichnet (CC_{10}). Der CC_{10} -Wert ist in den folgenden Abbildungen für jede Substanz besonders hervorgehoben.

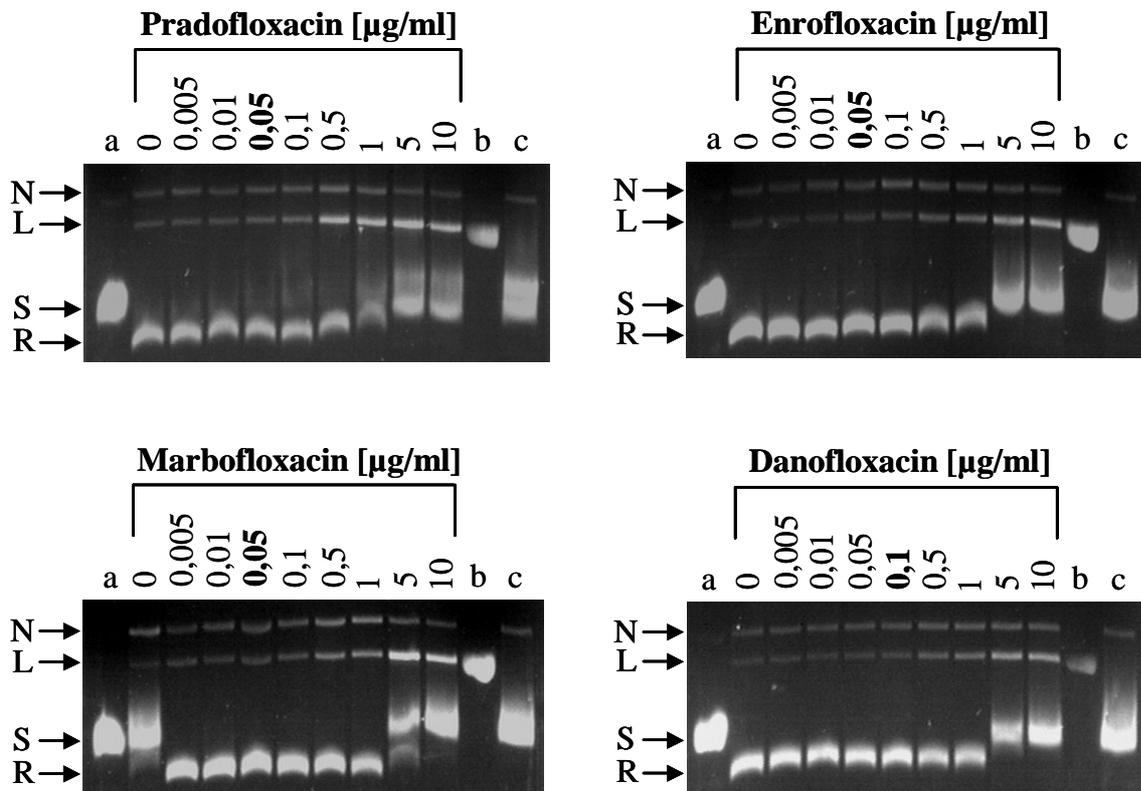
Abbildung 3.12: Stabilisierung von Gyrase-DNA-Komplexen durch Fluorchinolone

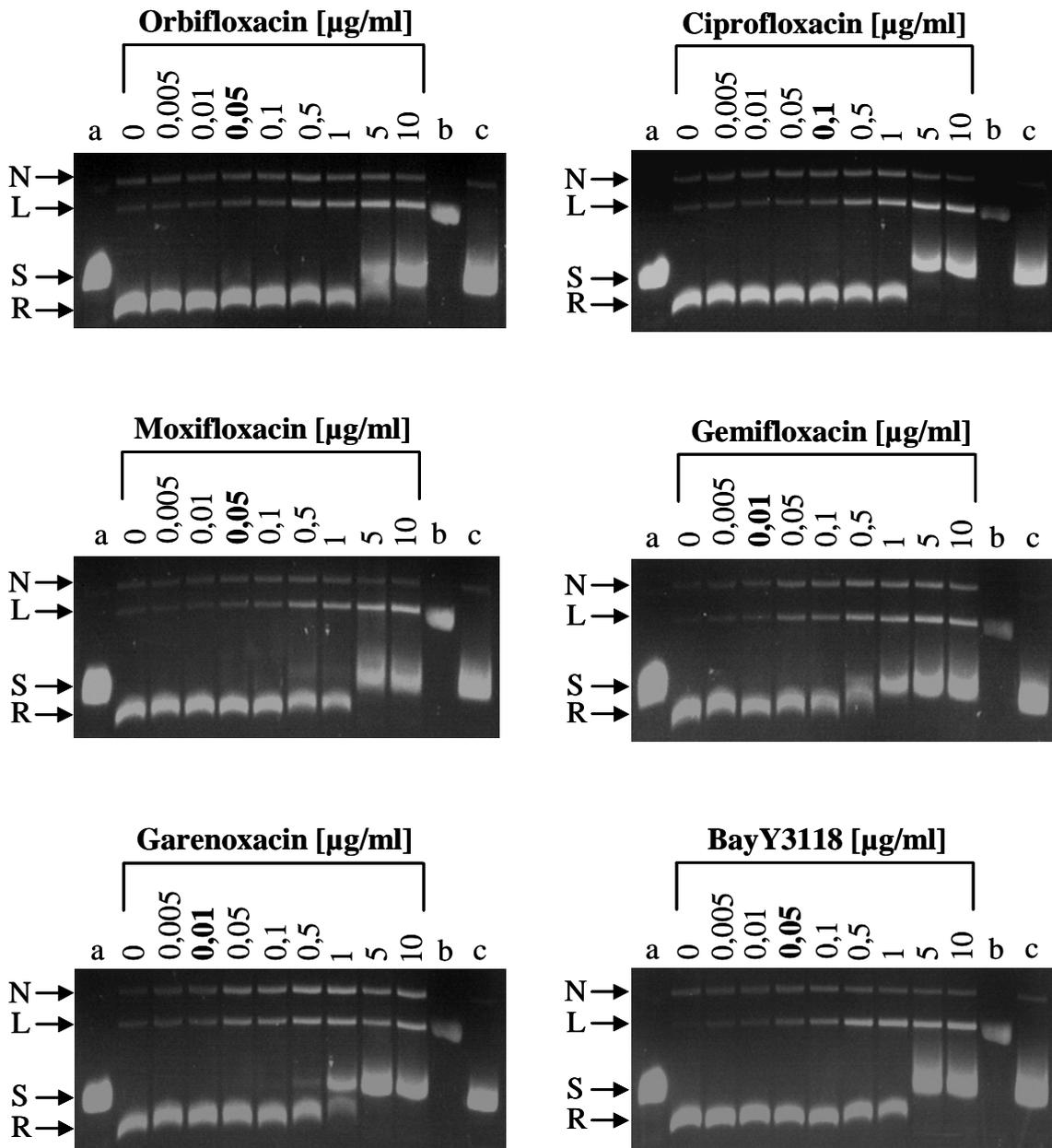




Hervorgehobene Zahlen = CC_{10} -Werte, a = Substratkontrolle (unbehandelte, relaxierte Plasmid-DNA), b = Cleavage-Kontrolle (lineare Plasmid-DNA), c = Spezifitätskontrolle (Cleavage-Ansatz mit Chinolon in der jeweils höchsten verwendeten Konzentration, jedoch ohne Gyrase), N = nicked DNA, L = lineare DNA, S = überspiralisierte DNA

Abbildung 3.13: Stabilisierung von Topoisomerase IV-DNA-Komplexen durch Fluorchinolone





Hervorgehobene Zahlen = CC₁₀-Werte, a = Substratkontrolle (unbehandelte, überspiralisierte Plasmid-DNA), b = Cleavage-Kontrolle (lineare Plasmid-DNA), c = Spezifitätskontrolle (Cleavage-Ansatz mit Chinolon in der jeweils höchsten verwendeten Konzentration, jedoch ohne Topoisomerase IV), N = nicked DNA, L = lineare DNA, S = überspiralisierte DNA, R = relaxierte DNA

Tabelle 3.10: Erforderliche Fluorchinolonkonzentrationen zur Stabilisierung von Gyrase- und Topoisomerase IV-DNA-Komplexen bei *E. coli*

Fluorchinolon	CC ₁₀ [µg/ml]	
	Gyrase	Topoisomerase IV
Pradofloxacin	0,005	0,05
Enrofloxacin	0,005	0,05
Marbofloxacin	0,005	0,05
Danofloxacin	0,005	0,1
Orbifloxacin	0,005	0,05
Ciprofloxacin	0,005	0,1
Moxifloxacin	0,01	0,05
Gemifloxacin	0,01	0,01
Garenoxacin	0,01	0,01
BayY3118	0,005	0,05

CC₁₀ = Konzentration, die einen ersten detektierbaren Cleavage hervorruft

Sowohl in Gyrase- als auch in Topoisomerase IV-Cleavage-Assays konnte eine lineare Zunahme des Cleavage-Produkts (entspricht einer Zunahme von Doppelstrangbrüchen) mit steigender Fluorchinolonkonzentration beobachtet werden. Die Generierung von Doppelstrangbrüchen in Abhängigkeit von der eingesetzten Fluorchinolonkonzentration konnte auch in früheren Untersuchungen gezeigt werden (282, 283, 411). In den vorliegenden Tests konnte darüber hinaus für alle Substanzen bei hohen Konzentrationen (zwischen 1 und 10 µg/ml) eine Inhibierung der jeweiligen Enzymaktivität (Überspiralisierung oder Relaxierung) gezeigt werden. In Abwesenheit der Enzyme konnte kein Cleavage-Produkt detektiert werden (s. Spezifitätskontrolle c). Eine Stabilisierung des Gyrase-DNA-Komplexes erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 0,005 bis 0,01 µg/ml (**Tabelle 3.10**). Dabei benötigten Prado-, Enro-, Marbo-, Dano-, Orbi- und Ciprofloxacin sowie BayY3118 eine Konzentration von 0,005 µg/ml, um einen ersten detektierbaren Cleavage hervorzurufen. Die CC₁₀-Werte für Garenoxacin, Moxi- und Gemifloxacin überstiegen diese Konzentration um das 2-fache. Für die Generierung eines Cleavage-Produktes in Anwesenheit von Topoisomerase IV benötigten Gemifloxacin und Garenoxacin 0,01 µg/ml, BayY3118, Prado, Enro- Marbo-, Orbi- und Moxifloxacin 0,05 µg/ml, Dano- und Ciprofloxacin 0,1 µg/ml.

3.2.2 Entwicklung eines Reportersystems zur Bestimmung der minimalen effektiven Chinolonkonzentration für die SOS-Induktion

Mit Hilfe der Cleavage-Assays wurde *in vitro* die Fähigkeit zur Stabilisierung von Typ II Topoisomerase-DNA-Komplexen untersucht. Die daraus resultierende Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen stellt das zentrale Ereignis der Chinolonwirkung dar, führt jedoch nicht unmittelbar zum Zelltod. Auf Grund der DNA-Läsion werden DNA-Reparatur-Gene (SOS-Antwort) induziert. Da die Doppelstrangbrüche jedoch nicht bzw. nur fehlerhaft durch die Enzyme der SOS-Antwort repariert werden können, kommt es zur dauerhaften Induktion der SOS-Antwort. Die irreparablen Schäden der DNA führen wahrscheinlich zur Aktivierung von Autolysinen die den bakteriellen Zelltod hervorrufen (141).

Ergänzend zu den *In-vitro*-Experimenten (Cleavage-Assays) sollten mit Hilfe eines *In-vivo*-Testsystems Aussagen über die Fähigkeit der untersuchten Chinolone zur Induktion der SOS-Antwort getroffen werden. Dazu wurde ein Reportersystem entwickelt, bestehend aus dem *recA*-Promotor und dem Luciferasegen von *Photinus pyralis* (Glühwürmchen). *precA* wurde auf Grund der zentralen Rolle von RecA (reguliert die SOS-Antwort) als Kontrollelement gewählt.

3.2.2.1 Konstruktion des Reportersystems

3.2.2.1.1 Amplifikation des *recA*-Promotors und des *luc*-Gens

Die Amplifikate des *recA*-Promotors (*precA*) und des Luciferasegens (*luc*-Gen) stellten die Ausgangsprodukte für das *precA-luc*-Reportersystem dar.

Für die Amplifikation von *precA* aus chromosomaler DNA des Stammes *E. coli* JM83 wurden die Primer RECA5-1 und RECA3-1 verwendet (**Tabelle 3.11**). Durch Primeranlagerung wurde im Verlaufe der PCR mit dem Primer RECA5-1 am 5'-Ende des Amplifikats eine *PstI*-Restriktionsschnittstelle mit einem 3 bp Überhang (notwendig für die Erkennung der Schnittstelle durch das Restriktionsenzym) sowie mit dem Primer RECA3-1 am 3'-Ende ein komplementärer Bereich zum *luc*-Gen hinzugefügt.

Das *luc*-Gen wurde mit Hilfe der Primer LUC5-B-1 und LUC3-3 (**Tabelle 3.11**) aus dem Plasmid pGEM5-*luc* amplifiziert. Mit dem LUC5-B-1 Primer erfolgte am 5'-Ende der Einbau einer komplementären Sequenz zum *recA*-Promotor, mit dem Primer LUC3-3 wurde am 3'-Ende eine *PstI*-Restriktionsschnittstelle (mit einem 3 bp Überhang) generiert.

Die *PstI*-Schnittstelle in den Amplifikaten ist Voraussetzung für eine nachfolgende Insertion in das Plasmid pBR322. Das Ergebnis der Amplifikationen wurde jeweils mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Das *precA*-Amplifikat ergab ein Fragment von ca. 320 bp, das der erwarteten Größe von 317 bp entsprach. Durch die Amplifikation des *luc*-Gens wurde ein Fragment von ca. 1750 bp erhalten, das der erwarteten Größe von 1730 bp entsprach (**Abbildung 3.14**). Die Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte nach der Gelelektrophorese von Qiagen (**2.2.2.6.2**).

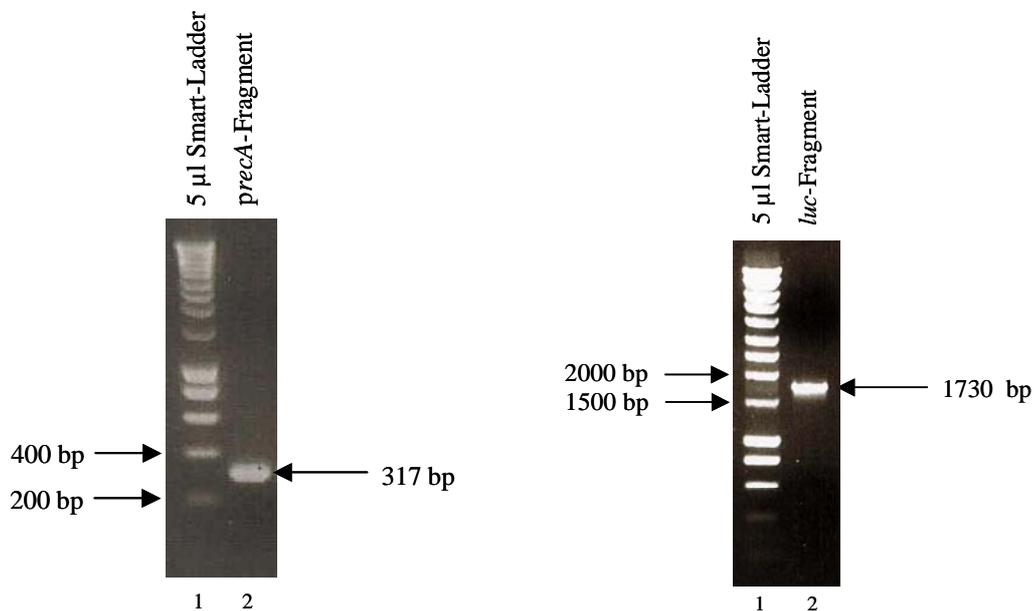
Tabelle 3.11: PCR-Ansatz für die DNA-Fragmente *precA* und *luc*

Reagenz	Volumen	
	PCR <i>precA</i>	PCR <i>luc</i>
10x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer	10 µl	10 µl
MgCl ₂ [25 mM]	8 µl	8 µl
RECA5-1 [10 pmol/µl]	2 µl	-----
RECA3-1 [10 pmol/µl]	2 µl	-----
LUC5-B-1 [10 pmol/µl]	-----	2 µl
LUC5-3-3 [10 pmol/µl]	-----	2 µl
dNTP-Mix [2 mM]	2,5 µl	2,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	0,5 µl
chromosomale DNA (JM83)	2 µl	-----
PGEM- <i>luc</i>	-----	2 µl
Reinstwasser	ad 100 µl	ad 100 µl

Die PCRs wurden mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

- | | | | |
|-------------------------|-------|--------|-------|
| 1) Initialdenaturierung | 95 °C | 5 min | } 36x |
| 2) Denaturierung | 95 °C | 45 sec | |
| 3) Annealing | 48 °C | 30 sec | |
| 4) Elongation | 72 °C | 5 min | |
| 5) Annealing | 48 °C | 30 sec | |
| 6) Elongation | 72 °C | 5 min | |

Abbildung 3.14: PCR-Amplifikate des *recA*-Promotors und des *luc*-Gens



3.2.2.1.2 Konstruktion der *precA-luc*-Fusion mittels SOEing PCR

Die Fusion des *recA*-Promotors mit dem *luc*-Gen erfolgte mit Hilfe der SOEing-PCR-Technik (2.2.2.4.2). Dazu wurden die erzeugten Fragmente (3.2.2.1.1) in einer PCR mit Hilfe ihrer zueinander komplementären Bereiche fusioniert (Tabelle 3.12). Die Amplifikation des Fusionsproduktes (*precA-luc*) erfolgte in einer zweiten PCR mit Hilfe der Primer RECA5-1 und LUC3-3 (Tabelle 3.13). Durch diese Primer wurde das *precA-luc*-Fragment am 3'- und 5'-Ende jeweils mit einer *Pst*I-Schnittstelle versehen.

Das Amplifikationsprodukt wurde anschließend mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.2.2.5) in einem 0,8%igen Agarosegel überprüft.

Tabelle 3.12: SOEing Ansatz I

Reagenz	Volumen
<u>Mix I</u>	
PCR-Fragment <i>precA</i>	x μ l
PCR-Fragment <i>luc</i>	y μ l
dNTP-Mix [10 mM]	1,25 μ l
Reinstwasser	ad 25 μ l
<u>Mix II</u>	
10x Polymerase-Puffer	5 μ l
MgCl ₂ [25 mM]	3 μ l
Expand-High-Fidelity-Polymerase	0,7 μ l
Reinstwasser	ad 25 μ l

Temperaturprofil der PCR-I:

1) Initialdenaturierung	95 °C	3 min	} 10x
2) Denaturierung	95 °C	30 sec	
3) Annealing	48 °C	60 sec	
4) Elongation	72 °C	4 min	
5) Annealing	48 °C	60 sec	
6) Elongation	72 °C	5 min	

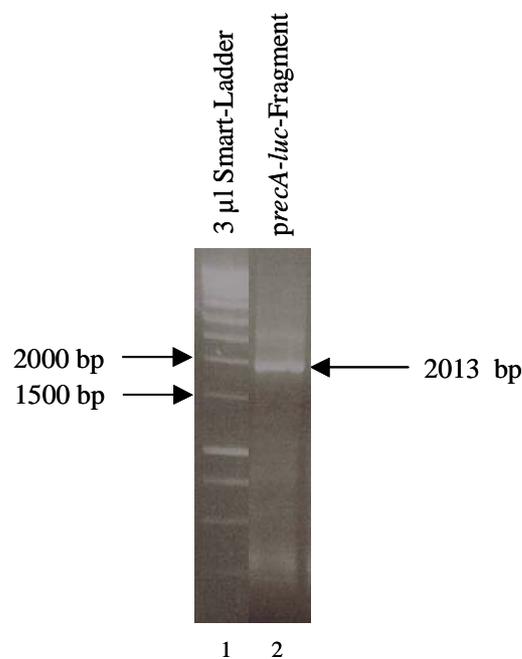
Tabelle 3.13: SOEing Ansatz II

Reagenz	Volumen
<u>Mix I</u>	
Ansatz I	10 μ l
dNTP-Mix [10 mM]	2,25 μ l
Primer LUC3-3 [10 pmol/ μ l]	2 μ l
Primer RECA5-1 [10 pmol/ μ l]	2 μ l
Reinstwasser	ad 25 μ l
<u>Mix II</u>	
10x Polymerase-Puffer	9 μ l
MgCl ₂ [25 mM]	7 μ l
Expand-High-Fidelity-Polymerase	0,7 μ l
Reinstwasser	ad 25 μ l

Temperaturprofil der PCR-II:

1) Initialdenaturierung	94 °C	3 min	
2) Denaturierung	94 °C	30 sec	} 36x
3) Annealing	48 °C	60 sec	
4) Elongation	72 °C	5 min	
5) Annealing	48 °C	60 sec	
6) Elongation	72 °C	5 min	

Abbildung 3.15: SOEing Produkt *preca-luc* und SOEing Nebenprodukte



Bei der SOEing PCR traten mehrere Banden im Gel auf (**Abbildung 3.15**). Da sich die Anzahl der Banden, z.B. durch Veränderung der Magnesiumchloridkonzentration (1,5 bis 3,6 mM) oder der Annealingtemperatur (48 bis 66 °C), nicht auf eine Bande reduzieren ließ, wurde die Bande, die der erwarteten Fragmentlänge von 2013 bp entsprach, aus dem Gel eluiert (s. **2.2.2.6.2**).

3.2.2.1.3 Subklonierung in pCR2.1-TOPO

Die direkte Klonierung des SOEing-Fragments in pBR322 war nicht erfolgreich (durchgeführt wurden 5 Versuche). Da die Vektorbande nach der Spaltung mit *Pst*I im Agarosegel eine Bande von ca. 4300 bp aufwies, konnte von einer erfolgreichen Linearisierung des 4361 bp großen Plasmids pBR322 ausgegangen werden. Die Ergebnisse der Kontrolltransformationen des Vektors in *E. coli* JM 109 (**Tabelle 3.14**) wichen nur geringfügig von den Sollwerten für diese Versuche (s. **2.2.2.7.2**) ab.

Tabelle 3.14: Kontrolltransformationen mit pBR322

Ansatz	PBR322	dephosphoryliert	ligiert	Koloniezahl*
1	linearisiert	–	–	15-22
2	linearisiert	+	–	13-22
3	linearisiert	–	+	186-356
4	linearisiert	+	+	9-16

* Da 5 Kontrolltransformationen (parallel zu 5 Klonierungsversuchen) durchgeführt wurden, ist in der Tabelle für jeden Ansatz ein Schwankungsbereich für die Koloniezahl angegeben.

Auf Grund der Ergebnisse der Spaltung des Vektors mit *Pst*I und der Ergebnisse der Kontrolltransformationen kann das Scheitern der Klonierungsversuche nicht mit dem Plasmid pBR322 in Zusammenhang gebracht werden. Beide *Pst*I-Schnittstellen des *precA-luc*-Fragments liegen nahe des 3'- und 5'-Endes, so dass diese möglicherweise nur unzureichend durch das Restriktionsenzym gespalten wurden.

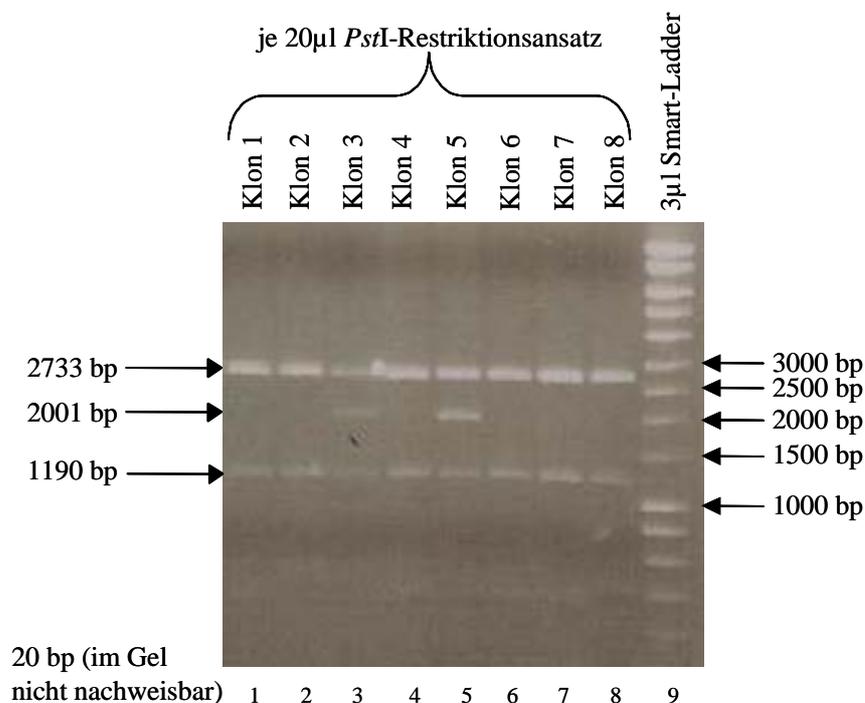
Zur Sicherung des *precA-luc*-Fragments erfolgte die Klonierung zunächst in das Plasmid pCR2.1-TOPO (**2.2.2.7.4**). Diese Klonierung ergab 12 weiße, auf Kanamycin [50 µg/ml] gewachsene Klone, die durch Replikaplattierung auf Kanamycin [50 µg/ml] gereinigt wurden. Aus allen Klonen wurden die enthaltenen Plasmide mit Hilfe der Plasmidminipräparation nach Qiagen (**2.2.2.3.2**) isoliert.

3.2.2.1.4 Charakterisierung rekombinanter *precA-luc*-pCR2.1-TOPO-Klone

Die isolierten Plasmide wurden mit *Pst*I gespalten, um das klonierte *precA-luc*-Fragment herauszuschneiden. Als Ergebnis der Spaltung wurden vier Restriktionsfrag-

mente der Größen 2733 bp, 2001 bp, 1190 bp und 20 bp erwartet. Von 30 Klonen zeigten 8 Klone (R3, R5, R9, R18, R21, R24, R25, R29) nach der Spaltung und der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung drei Banden, von denen eine dem 2001 bp großen *precA-luc-PstI*-Restriktionsfragment entsprach. Die vierte Bande (20 bp) konnte im Gel auf Grund ihrer geringen Größe nicht nachgewiesen werden. Als Beispiel ist in **Abbildung 3.16** das Ergebnis der Spaltung der Klone 1 bis 8 dargestellt. Es ist erkennbar, dass die Klone R3 und R5 je ein Fragment besitzen, dessen Größe dem *precA-luc*-Fragemt entspricht.

Abbildung 3.16: Durch *PstI*-Spaltung erhaltene Fragmente der aus *E. coli* TOP10F' isolierten Plasmide



3.2.2.1.5 Charakterisierung der rekombinanten *precA-luc*-pCR2.1-TOPO-Plasmide

Zur Bestimmung der relativen Orientierung des Fragments zum Vektor wurden die rekombinanten Plasmide aus den Klonen R3, R5, R9, R18, R21, R24, R25 und R29 mit *EcoRV* verdaut. Die zu erwartenden Fragmente für Orientierung I sollten eine Größe

von 387 bp und 5557 bp, für Orientierung II von 1657 bp und 4287 bp aufweisen (**Abbildung 3.17**). Nach der Spaltung konnte gezeigt werden, dass alle Fragmente in Orientierung II vorlagen. Das vorliegende Plasmidkonstrukt wurde als pPHB441 bezeichnet (Plasmidkarte s. **Abbildung 3.18**).

Abbildung 3.17: Erwartete Fragmentgrößen nach *EcoRV*-Spaltung

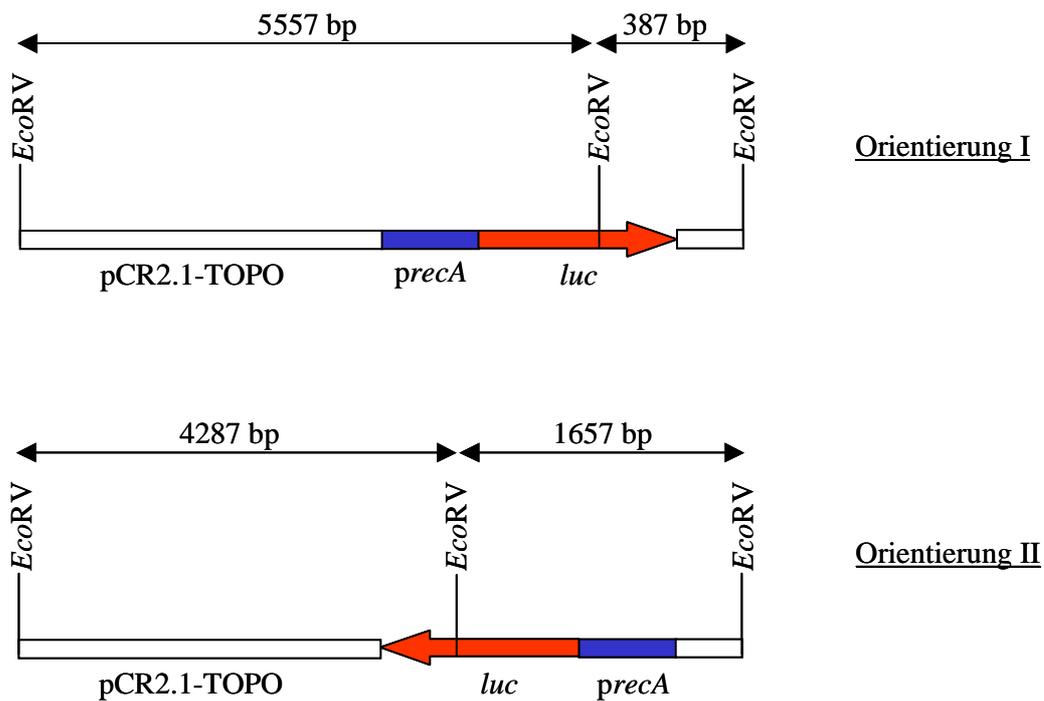
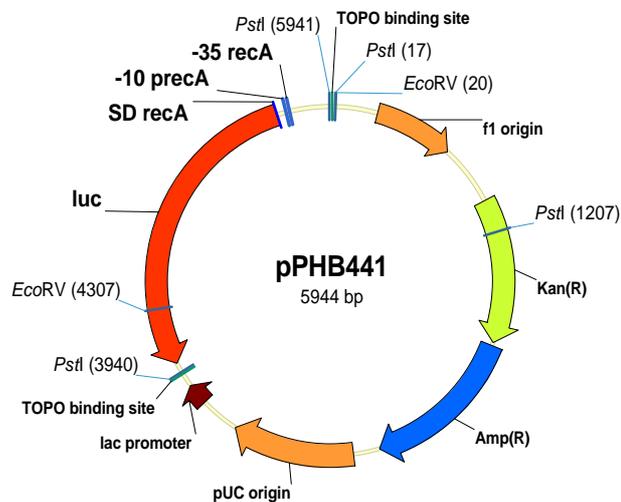


Abbildung 3.18: Plasmid pPHB441



Durch die zusätzliche Sequenzierung (2.2.2.9) der Plasmide aus den Klonen R3, R5, R9, R18, R21, R24, R25 und R29 mit dem Primer LUC-O wurden die Inserts als *precA-luc*-Fragmente identifiziert und deren Orientierung in den Plasmiden bestätigt.

3.2.2.1.6 Transformation des Plasmids pPHB441 in *E. coli* ER1821

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität bzw. SOS-Induktion ist ein intaktes *recA*-Gen erforderlich, da der Promotor des Reportergenplasmids *precA* nur in Anwesenheit eines funktionstüchtigen RecA-Proteins angesprochen wird. Eine DNA-Schädigung führt zur Aktivierung des – in der uninduzierten Zelle in geringen Mengen vorhandenen (ca. 7200 Protein-Moleküle) – RecA-Proteins durch einen Autoregulationsprozess (386). In der aktivierten Form kann RecA die Spaltung des SOS-Gen-Repressors LexA positiv beeinflussen (208). Durch die Loslösung des Repressors von den SOS-Gen-Promotoren – also auch des *recA*-Promotors – wird die Transkription der SOS-Gene bzw. eine Induktion des SOS-Systems erst möglich. Da TOP10F'-Zellen kein aktives *recA*-Gen besitzen, war es erforderlich, das Plasmid pPHB441 in *recA*⁺-Zellen zu transformieren. Mit Hilfe der CaCl₂-Methode (2.2.2.8.1) wurden kompetente *E. coli* ER1821 Zellen (*recA*⁺) hergestellt und mit Plasmiden der 8 rekombinanten Klone (s. oben) transformiert. Die Transformationsansätze wurden in Anwesenheit von Kanamycin [50 µg/ml] ausplattiert.

Die Transformation von *E. coli* ER1821 lieferte mit allen 8 Plasmiden vergleichbare Zellzahlen Kanamycin resistenter Transformanden.

3.2.2.1.7 Luciferaseaktivitätsscreening mit *E. coli* ER1821-pPHB441-Transformanden

Die Klone R3, R5, R9, R18, R21, R24, R25 und R29 wurden in einem ersten Screening im Luminometer auf Luciferaseaktivität getestet. Die Bestimmung der absoluten Luciferaseaktivität (Messung eines Biolumineszenzsignals ohne Bezug auf die Zelldichte) in An- und Abwesenheit eines SOS-Induktors diente dazu, zu überprüfen, ob eine korrekte Fusion des *precA*-Promotors mit dem *luc*-Gen vorlag und eine funktionstüchtige Lucife-

rase gebildet wurde. Da die absolute Luciferaseaktivität mit einer subinhibitorischen Konzentration von Ciprofloxacin gemessen werden sollte, wurde zunächst die MHK von Ciprofloxacin für ER1821 in Mehrfachbestimmungen ermittelt. Die MHK betrug 0,008 bzw. 0,015 µg/ml.

Der Induktionstest wurde daher wie unter **2.2.2.10** beschrieben mit 0,004 µg/ml Ciprofloxacin durchgeführt. Zur Selektion auf pPHB441-haltige Zellen wurde den Kulturen 50 µg/ml Kanamycin hinzugefügt. Die absolute Luciferaseaktivität wurde als „relative light units“ (RLU) bestimmt.

Tabelle 3.15: Einfluss von Ciprofloxacin [0,004 µg/ml] auf die absolute Luciferaseaktivität rekombinanter Klone von *E. coli* ER1821 + pPHB441

Stamm bzw. Klon	RLU		Anstieg der Luciferaseaktivität nach Zugabe von Ciprofloxacin
	ohne Cip	Cip [0,004 µg/ml]	
ER 1821	41*	-----	-----
R3	12843	20367	58,6%
R5	39350	60476	53,7%
R9	26	28	7,7%
R18	100	110	10,0%
R21	34	37	8,8%
R24	28371	39761	40,1%
R25	2495	12381	396,2%
R29	26121	39289	50,4%

* = ohne Zusatz von Kanamycin [50 µg/ml], RLU = relative light units

Im uninduzierten Zustand lagen die RLU-Werte für die Klone R9, R18 und R21 im Bereich von 26 bis 100. Ihre Werte waren daher ähnlich gering wie der RLU-Wert des Wildtypstamms ER 1821. Im Vergleich dazu lagen die RLU-Werte der Klone R3, R5, R24, R25 und R29 bereits im uninduzierte Zustand weit über dem Wert des Wildtyps (61- bis 960-fach). Darüber hinaus erwies sich die Luciferase in den zuletzt genannten Klone als induzierbar, da die RLU-Werte nach Chinolonzugabe die Werte im uninduzierten Zustand um 40 bis 396% überstiegen (**Tabelle 3.15**). Hingegen wichen die RLU-Werte der Klone R9, R18 und R21 im induzierten Zustand nur geringfügig von den entsprechenden uninduzierten Werten ab. Die Klone R9, R18 und R21 galten somit als nicht induzierbar.

3.2.2.1.8 Sequenzanalyse von pPHB441-Plasmiden aus *E. coli* ER1821-Transformanden

Die rekombinanten Plasmide aus Transformanden, welche nach Zugabe von Ciprofloxacin im Vergleich zu nicht induzierten Zellen eine Zunahme der Lumineszenz um mehr als 25% zeigten (R3, R5, R24, R25, R29), wurden durch Sequenzanalyse mit den Primern RECA3-1 (Promotorregion), LUC-M (*precA-luc*-Fusionsregion) und LUC-O (Ende des *luc*-Gens) näher charakterisiert und mit der publizierten DNA-Sequenz für diese Bereiche verglichen (296, 325). Die Bindungsstellen der Primer im *recA*-Promotor- bzw. *luc*-Genbereich sind der **Tabelle 2.4 (2.1.3)** zu entnehmen.

In vier der fünf Klone traten Mutationen im Bereich der *precA-luc*-Fusion sowie im Bereich des *recA*-Promotors auf. Nur die Sequenzanalyse des Klons R5 ergab eine vollständige Übereinstimmung der sequenzierten Bereiche mit Daten aus der Literatur. Dieser Klon zeigte auch die höchsten Luciferaseaktivitäten im un- bzw. induzierten Zustand (**Tabelle 3.15**).

3.2.2.1.9 Vorbereitung des *precA-luc*-Fragments und des Vektors für die Umklonierung in pBR322

Um in den späteren Versuchen die Induktion der SOS-Antwort unter möglichst realen Bedingungen (ein bakterielles Chromosom mit einem *recA*-Promotor) messen zu können, erfolgte die Umklonierung des *precA-luc*-Fragments aus dem high-copy Vektor pCR2.1-TOPO in pBR322, einen Vektor mit geringerer Kopienzahl (low-copy).

Das Fusionsgen wurde aus Plasmid pPHB441 (aus Klon 5) durch Restriktionsverdau mit *Pst*I herausgeschnitten und durch Gelelution (**2.2.2.6.2**) aufgereinigt. Die Abschätzung der Konzentration des aufgereinigten Fragments erfolgte nach der Auftrennung im Agarosegel durch visuellen Vergleich mit dem mitgeführten Längen- und Konzentrationsstandard, Smart-Ladder[®]. Die Abschätzung ergab eine Konzentration des *precA-luc*-Fragments von 10 ng/μl.

Der Vektor pBR322 (4361 bp) wurde mit Hilfe der Midipräparation (**2.2.2.3.3**) aus *E. coli* JM109 isoliert, mit *Pst*I linearisiert und anschließend über eine Silikasäule aufgereinigt (**2.2.2.6.1**). Die Größe des aufgereinigten Produkts wurde mittels Agarosegel-

elektrophorese überprüft und entsprach einem Fragment von ca. 4300 bp. Die Abschätzung der Konzentration des linearisierten Plasmids erfolgte wie oben beschrieben und ergab ebenfalls eine Konzentration von 10 ng/µl. Um eine Selbstligation des Vektors in der folgenden Ligation zu verhindern, wurde das linearisierte Plasmid mit Shrimp alkalischer Phosphatase[®] behandelt (2.2.2.7.2).

3.2.2.1.10 Klonierung in pBR322

Die Ligation des mit *Pst*I aus Klon 5 herausgeschnittenen *precA-luc*-Fragments mit dem *Pst*I linearisierten Vektor pBR322 erfolgte wie unter 2.2.2.7.3 beschrieben. Im Anschluss wurden kompetente Zellen des *E. coli* Stammes ER1821 mit dem Ligationsansatz transformiert. Die Selektion rekombinanter pBR322-Derivate erfolgte auf Chinablau-Laktose-Agar-Platten mit Tetracyclinzusatz [10 µg/ml]. Nach einer Inkubation von 24 h wurden 100 Klone zufällig ausgewählt und auf Chinablau-Laktose-Agarplatten mit Zusatz von Ampicillin [50 µg/ml] bzw. Tetracyclin [10 µg/ml] replikaplatziert. Rekombinante Klone, die das *precA-luc*-Gen in der *Pst*I-Schnittstelle des Vektors pBR322 enthielten, wuchsen in Anwesenheit von Tetracyclin, jedoch nicht in Gegenwart von Ampicillin (durch die Insertion des *precA-luc*-Fragments wurde das Gen *bla* des Vektors, das für die TEM-1 β-Laktamase codiert, inaktiviert).

Aus Klonen, die nur in Anwesenheit von Tetracyclin, nicht aber von Ampicillin wuchsen, wurde die Plasmid-DNA isoliert (2.2.2.3.2).

3.2.2.1.11 Charakterisierung der rekombinanten pBR322-*precA-luc*-Plasmide

Die aus den Klonen isolierte Plasmid-DNA (3.2.2.1.10) wurde zunächst ungespalten gelelektrophoretisch aufgetrennt und ihre Größe im Vergleich mit ungespaltenem Plasmid pBR322 (ohne *precA-luc*-Fragment) bestimmt. Klone, die eine Supercoilbande mit geringerer Mobilität als die der Kontrolle aufwiesen, wurden weiter charakterisiert. Dazu wurden die isolierten rekombinanten Plasmide mit *Pst*I gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

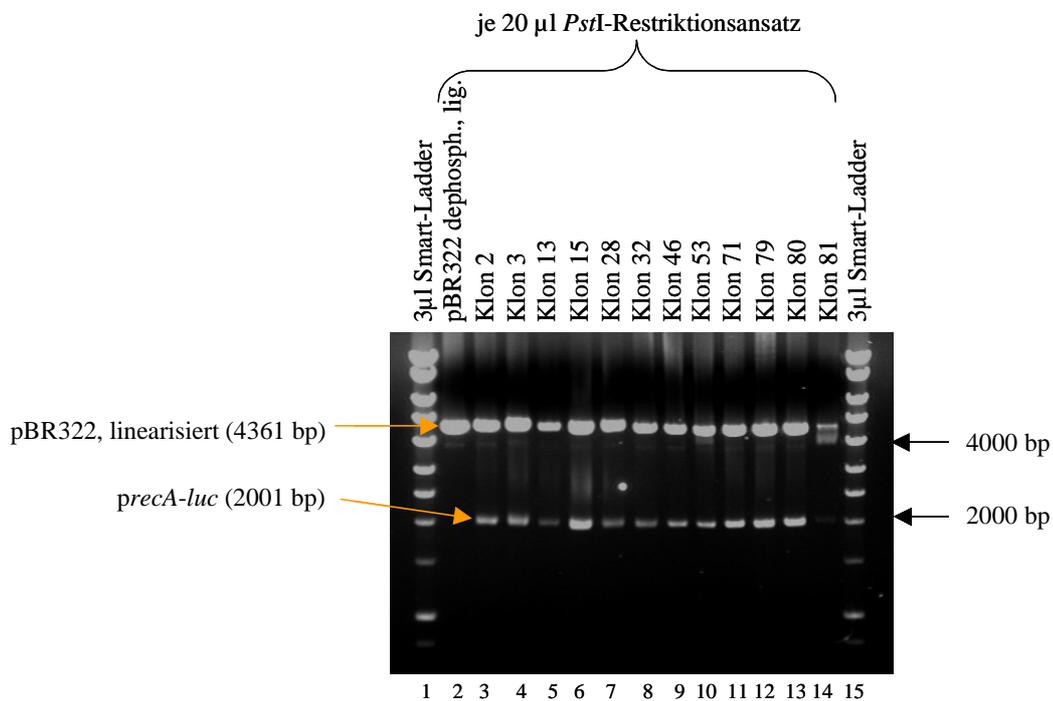
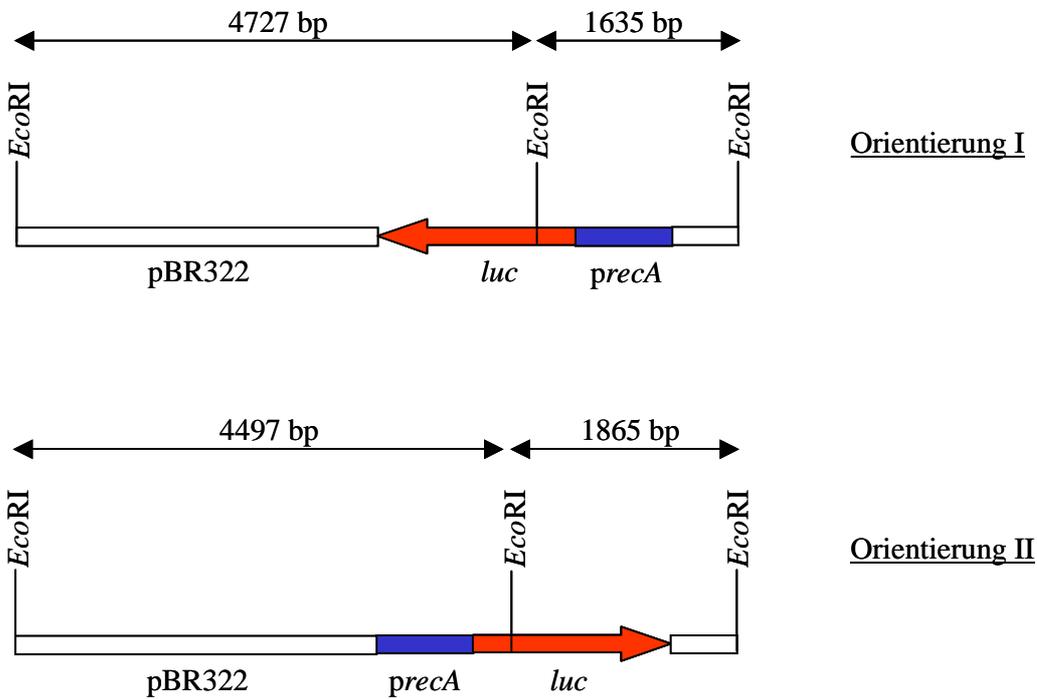
Abbildung 3.19: Überprüfung der Plasmide durch Spaltung mit *Pst*I

Abbildung 3.19 zeigt das Ergebnis der Restriktionsspaltung mit *Pst*I. Bis auf das Plasmid aus Klon 81 (Lane 14) besaßen alle Plasmide im Vergleich zur geschnittenen Vektorkontrolle (Lane 2) ein zusätzliches *Pst*I-Fragment, das der Größe des *precA-luc*-Inserts (2001 bp) entsprach.

3.2.2.1.12 Bestimmung der Orientierung des *precA-luc*-Fusionsgens in pBR322-Konstrukten

Die relative Orientierung des Fragments zu Signalsequenzen der Transkriptionsregulation (Promotor, Terminator) von Vektor eigenen Genen (z.B. Resistenzgenen) kann möglicherweise in späteren Versuchen die zu bestimmende Luciferaseaktivität beeinflussen. Da für die Klonierung des *precA-luc*-Fusionsgens in pBR322 nur eine einzelne Restriktionsendonuklease – *Pst*I – verwendet wurde, können zwei mögliche Fragmentorientierungen auftreten (**Abbildung 3.20**).

Abbildung 3.20: Erwartete Fragmentgrößen nach *EcoRI*-Spaltung



Zur Bestimmung der Orientierung wurden die rekombinanten Plasmide mit *EcoRI* gespalten und in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Abbildung 3.21: Bestimmung der relativen Orientierung des *precA-luc*-Genfragments in pBR322-Konstrukten durch *EcoRI*-Restriktionsspaltung

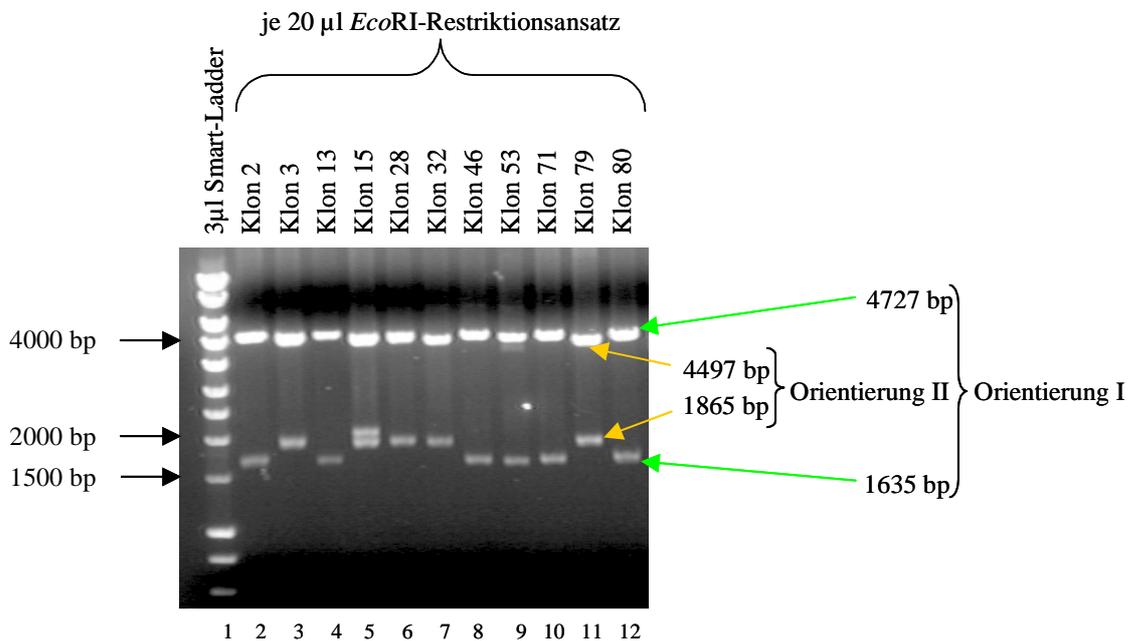
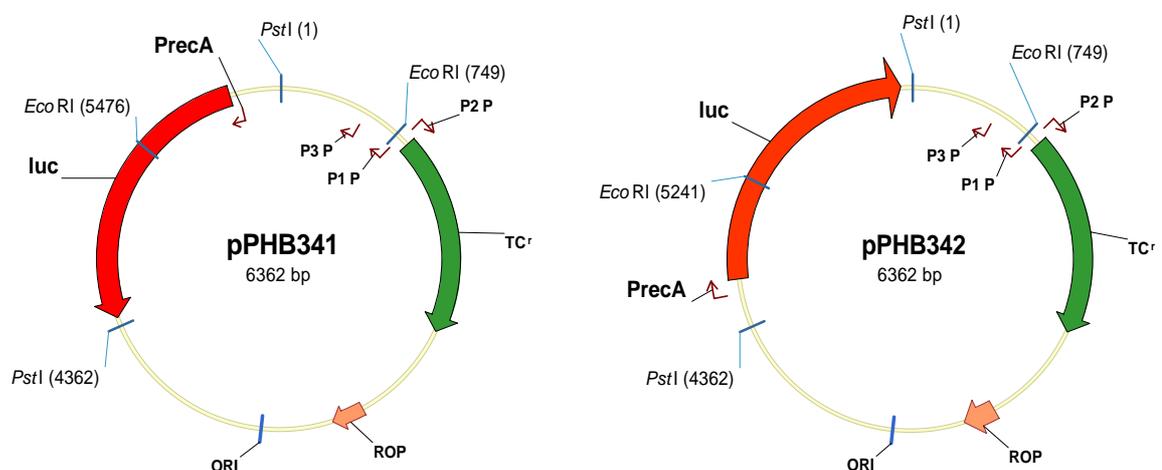


Abbildung 3.21 kann entnommen werden, dass beide relativen Orientierungen für das *precA-luc*-Gen-Fragment in pBR322 auftraten. Die erhaltenen Restriktionsfragmente entsprachen den errechneten Fragmentgrößen. Rekombinante Plasmide aus den Klonen 2, 13, 46, 53, 71 und 80 besaßen Fragmente der Größen, die der Orientierung I entsprachen (1635 bp und 4727 bp). Diese Plasmidkonstrukte wurden als pPHB341 (**Abbildung 3.22**) bezeichnet. Die Plasmide der Klone 3, 28, 32 und 79 besaßen Fragmente der Größen, die der Orientierung II zugeordnet werden können (1865 bp und 4497 bp). Diese Plasmidkonstrukte wurden pPHB342 (**Abbildung 3.22**) genannt. Das Plasmid aus Klon 15 wies zusätzlich zu den Banden der Orientierung II noch eine dritte Bande auf und wurden deshalb nicht weiter untersucht.

Die Orientierung der Fragmente korrelierte mit der Kolonimorphologie: Klone mit Plasmid pPHB341 (Orientierung I) wuchsen auf den Selektionsplatten als kleine, dunkelblaue Kolonien heran, während Klone mit Plasmid pPHB342 (Orientierung II) als große, blaue Kolonien erschienen.

Abbildung 3.22: Plasmidkonstrukte pPHB341 und pPHB342



3.2.2.1.13 Luciferaseaktivitätsscreening mit *E. coli* ER1821 pPHB341-/pPHB342-Transformanden

Die rekombinanten Klone wurden anschließend in einem Screening auf Luciferaseaktivität untersucht. Als Antibiotikum zur Selektion diente Tetracyclin [10 µg/ml]. Die

Transkription des *luc*-Gens wurde durch Ciprofloxacin in einer Konzentration von [0,004 µg/ml] induziert. Die Klone 28 (Orientierung II) und 46 (Orientierung I) zeigten ein hohes Induktionspotential. Nach Chinolonzugabe stieg die absolute Luciferaseaktivität im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle um 1286% bzw. 801% an. Beide Klone wurden durch Sequenzierung weiter charakterisiert.

3.2.2.1.14 Sequenzierung des gesamten *precA-luc*-Fragments

Die komplette Sequenzierung der *precA-luc*-Fragmente der Klone 28 und 46 wurde mit den Primern LUC-I-1, LUC-I-2, LUC-M, LUC-M-2, LUC-O, LUC-O-2 und REC-A-3-1 durchgeführt. Auf diese Weise konnte zum einen die Orientierung der Fragmente in pBR322 bestätigt werden. Zum anderen konnte durch die gesammelten Sequenzdaten gezeigt werden, dass beide Klone weder im *recA*-Promotor noch im *luc*-Gen Mutationen aufwiesen und somit über einen funktionstüchtigen *recA*-Promotor sowie ein funktionsfähiges *luc*-Gen verfügten.

3.2.2.1.15 Transformation von pPHB341 und pPHB342 in *E. coli* WT, WT-4, WT-3-1 und WT-K

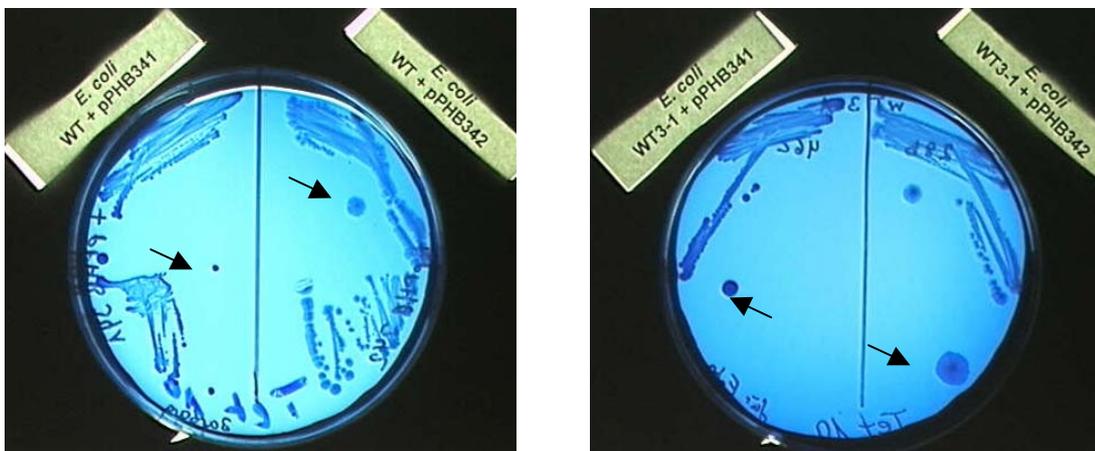
Die Plasmide der Klone 28 (pPHB342) und 46 (pPHB341) wurden für die Ermittlung der Chinolon induzierten *recA*-Induktion in die eigentlichen Teststämme *E. coli* WT (Wildtyp) und dessen isogenen Mutanten WT-4 (*parC*-Mutante), WT-3-1 (*gyrA*-Doppelmutante) und WT-K (*gyrB*-Mutante) transformiert. Zusätzlich wurden die Stämme mit dem Plasmid pPHB340 (pBR322 + *luc*-Gen ohne *recA*-Promotor) transformiert. Dieses Plasmid diente in den Induktions-Versuchen als Negativ-Kontrolle für die Luciferaseaktivität.

Alle Stämme wurden erfolgreich mit pPHB341 bzw. pPHB342 transformiert. Das Plasmid pPHB340 konnte nur in WT-K übertragen werden.

Im Anschluss wurden die auf Tetracyclin [10 µg/ml] selektierten Klone photographiert. Beispielhaft sind in **Abbildung 3.23** die Transformanden von *E. coli* WT und WT-3-1 abgebildet.

Wie bereits unter **3.2.2.1.12** erläutert, zeigten die Transformanden Unterschiede in der Koloniemorphologie, abhängig davon, ob sie Plasmid pPHB341 oder pPHB342 enthielten. Mit pPHB341 (Orientierung I) transformierte Stämme erschienen als kleine, scharfbegrenzte, dunkelblaue Kolonien, mit pPHB342 (Orientierung II) als große, unregelmäßig begrenzte, blaue Kolonien. Somit konnte bereits visuell von einer erfolgreichen Klonierung ausgegangen werden.

Abbildung 3.23: Koloniemorphologie von *E. coli* WT bzw. WT-3-1 mit pPHB341/ pPHB342



Die Photographien wurden mit Hilfe der ProViDoc-Anlage (Fa. Sarsted) angefertigt. Pfeile verweisen auf die unterschiedlich großen und gefärbten Einzelkolonien der mit pPHB341 bzw. pPHB342 transformierten *E. coli* Bakterien.

3.2.2.1.16 Luciferaseaktivitätsscreening mit *E. coli* WT, WT-4, WT-3-1 und WT-K Klonen

Für jeden Stamm wurden je zwei Klone – die entweder Plasmid pPHB341 oder pPHB342 enthielten – ausgewählt und für den Nachweis auf Luciferaseaktivität herangezogen. Als Negativ-Kontrolle dienten entsprechende plasmidfreie Zellen, da sie auf Grund eines fehlenden Luciferase-Reportergenplasmids keine Luciferaseaktivität zeigen durften. Abweichend von **2.2.2.10** wurden 5 µl lysierte Zellen mit 50 µl Luciferase-Assay-Reagent[®] gemischt und luminometrisch vermessen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3.16** dargestellt.

Tabelle 3.16: Absolute Luciferaseaktivitäten der Stämme *E. coli* WT, WT-4, WT-3-1 und WT-K vor und nach der Induktion mit Ciprofloxacin

Stamm (Klon)	Plasmid	Morphologie	RLU		Anstieg der Luciferaseaktivität nach Induktion
			ohne Cip	mit Cip [0,004 µg/ml]	
WT-3-1	-----		15*	n.b.	n.b.
A⁺	pPHB342	g / u / b	10575	10604	0,27%
B	pPHB342	g / u / b	1392	12693	811,85%
C	pPHB341	k / s / db	46173	46582	0,88%
D	pPHB341	k / s / db	45944	52337	13,91%
WT-4	-----		13*	n.b.	n.b.
E	pPHB342	g / u / b	21106	24139	14,37%
F	pPHB342	g / u / b	15035	27094	80,21%
G	pPHB341	k / s / db	50150	27783	-44,6%
H	pPHB341	k / s / db	40095	42091	4,98%
WT	-----		13*	n.b.	n.b.
I	pPHB342	g / u / b	9536	17065	78,95%
J	pPHB342	g / u / b	41901	44726	6,74%
K	pPHB341	k / s / db	36761	40347	9,75%
L	pPHB341	k / s / db	37504	41323	10,18%
WT-K	-----		11*	n.b.	n.b.
M	pPHB342	g / u / b	11397	14678	28,79 %
N	pPHB342	g / u / b	9273	11210	83,23%
O	pPHB340		11	8	n.b.
P	pPHB340		7	18	n.b.
Q	pPHB341	k / s / db	25832	38570	49,31%
R	pPHB341	k / s / db	35325	37898	7,28%

* = Zellanzucht ohne Zusatz von Tetracyclin [50 µg/ml] und Ciprofloxacin, ⁺ = die Verwendung der Großbuchstaben zusätzlich zum Stammnamen diente in diesem Versuch der besseren Unterscheidung der Klone, die ein gleiches Plasmid trugen, grüne Großbuchstaben = nur diese Klone wurden für weitere Untersuchungen verwendet, g / u / b = große, unscharf begrenzte, blaue Kolonien, k / s / db = kleine, scharf begrenzte, dunkelblaue Kolonien, RLU = relative light units, Cip = Ciprofloxacin, n.b. = nicht bestimmt

Klon WT-K mit pPHB340 (Kontrollplasmid mit *luc*-Gen ohne Promotor) zeigte sowohl vor als auch nach der Induktion mit Ciprofloxacin vergleichbar niedrige RLU-Werte (7 bis 18). Anhand dieser Kontrolle konnte gezeigt werden, dass keine Aktivierung der Luciferase-Expression ohne *recA*-Promotor möglich war. Eine Veränderung der Luciferase-Expression in Klonen mit pPHB341 oder pPHB342 sollte somit auf die Aktivität

des *recA*-Promotors zurückzuführen sein. Im Vergleich zu den RLU-Werten von WT-K mit pPHB340 ergab die Messung der Biolumineszenz der plasmidfreien Stämme ebenfalls niedrige RLU-Werten (11 bis 15) (Hintergrundaktivität des Systems). Die RLU-Werte der untersuchten Transformanten im uninduzierten Zustand lagen für beide Plasmide pPHB341 und pPHB342 mindestens 93-fach höher als die Werte der plasmidfreien Stämme. Eine Induktion der Luciferase-Expression über 20% wurde lediglich bei 7 Klonen nachgewiesen. Die höchsten Induktionswerte zeigten dabei die pPHB342 tragenden Klone WT-3-1 B (811,85%), WT-4 F (80,21%), WT I (78,95%) und WT-K N (83,23%). (Anmerkung: Die Verwendung der Großbuchstaben zusätzlich zum Stammnamen diente in diesem Versuch der besseren Unterscheidung der Klone, die ein gleiches Plasmid trugen.) Die Fragmentorientierung in pBR342 hatte offensichtlich einen Einfluss auf die Höhe des Biolumineszenzsignals. In diesen Plasmiden lag die Leserichtung das *precA-luc*-Fragments entgegengesetzt zu der des nahegelegenen Ampicillinpromotors. In pPHB341 tragenden Klonen (zeigten geringere RLU-Werte) stimmte die Leserichtung von Fragment und Ampicillinpromotor überein (**Abbildung 3.22**). Möglicherweise beeinflusst der Ampicillinpromotor im Falle der Fragmentorientierung I die Ablösung des LexA-Repressors von der Operatorregion des *recA*-Promotors bzw. die Bindung der RNA-Polymerase. Beides könnte zu einer Abschwächung der Luciferase-Expression führen. Für die nachfolgende Optimierung des Reporterassays (hinsichtlich einer empfindlichen Messung der Luciferaseaktivität bzw. der *recA*-Induktion und der Reproduzierbarkeit der Messwerte) sowie für die spätere Bestimmung der minimalen SOS induzierenden Konzentration wurden daher die Klone WT-3-1 B, WT-4 F, WT I und WT-K N (s. grüne Markierung in **Tabelle 3.16**) verwendet. Zur besseren Übersicht wurde die Klonbezeichnung durch die Plasmidbezeichnung (z.B. WT + pPHB342 anstatt WT I) ersetzt.

3.2.2.2 Optimierung des Testsystems für die Bestimmung der spezifischen Luciferaseaktivität

3.2.2.2.1 Bestimmung der MHK-Werte gegenüber den *E. coli* Stämmen WT, WT-4, WT-3-1 und WT-K in Anwesenheit des Reporterplasmids pPHB342

Mit der Bestimmung der MHK von Prado-, Enro-, Marbo-, Cipro- und Moxifloxacin gegenüber den Teststämmen mit Plasmid pPHB342 sollte geprüft werden, ob die Empfindlichkeit der Bakterien durch das Plasmid beeinflusst wird.

In *Tabelle 3.17* sind die MHK-Werte in An- und Abwesenheit von pPHB342 zusammengefasst.

Tabelle 3.17: MHK-Werte verschiedener Fluorchinolone gegenüber den Stämmen WT, WT-4, WT-3-1 und WT-K mit und ohne Reporterplasmid

Stamm	MHK [$\mu\text{g/ml}$]				
	Pra	Enr	Mar	Cip	Mox
WT					
+ pPHB342	0,0156	0,03125	0,03125	0,0156	0,0625
- pPHB342	0,0156	0,03125	0,03125	0,0156	0,0625
WT-4					
+ pPHB342	0,0156	0,0156	0,0156	0,0078	0,0625
- pPHB342	0,03125	0,0156	0,0156	0,0078	0,03125
WT-3-1					
+ pPHB342	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5
- pPHB342	0,25	0,25	0,5	0,25	0,5
WT-K					
+ pPHB342	0,0625	0,125	0,125	0,125	0,1255
- pPHB342	0,0625	0,125	0,125	0,0625	0,0625

Pra = Pradofloxacin, Enr = Enrofloxacin, Mar = Marbofloxacin, Cip = Ciprofloxacin, Mox = Moxifloxacin

Die Anwesenheit des Plasmids pPHB342 hatte auf die MHK-Werte keine über den Fehlerbereich der Methode von einer Verdünnungsstufe hinausgehende Auswirkung.

Für die Optimierung des Luciferaseassays bzw. die spätere Bestimmung der MSIC (minimale SOS induzierende Konzentration) der Chinolone gegenüber den Teststämmen wurden die MHK-Werte der mit Plasmid pPHB342 transformierten Stämme zu Grunde

gelegt. Ausgehend von der 0,5-fachen MHK wurden die Fluorchinolonekonzentrationen jeweils um die Hälfte reduziert.

3.2.2.2.2 Bestimmung des optimalen Volumenverhältnisses von Luciferase-Assay-Reagent und Bakterienlysat zur Bestimmung der Luciferaseaktivität

Die Ermittlung des Bereiches, in dem eine lineare Korrelation zwischen der Höhe des Biolumineszenzsignals (RLU) und der eingesetzten Menge an Bakterienlysat besteht, wurde mit einer mit Ciprofloxacin (0,0039 µg/ml entspricht 0,5-facher MHK von WT-4) induzierten Probe von *E. coli* WT-4 + pPHB342 durchgeführt.

Der Teststamm wurden zunächst bis zum Erreichen einer OD_{546nm} von 0,006 bis 0,008 (entspricht einer Zellzahl von 1 bis $5,8 \times 10^7$ KBE/ml) bei 37 °C und 130 upm in NI-Bouillon inkubiert. Nach Zugabe des Chinolons erfolgte bei einer OD_{546nm} von 0,4 bis 0,6 die Probenentnahme zur Bestimmung der absoluten Luciferaseaktivität (90 µl Probe + 10 µl K₂HPO₄ Puffer). Die Zellyse wurden wie unter **2.2.2.10** beschrieben durchgeführt.

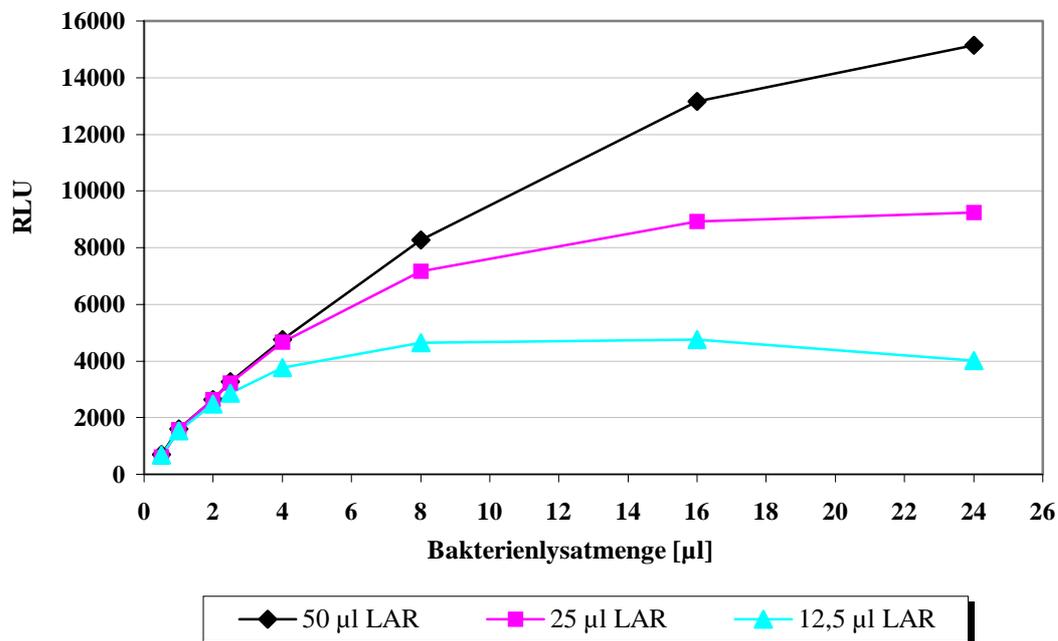
Im Anschluss wurden verschiedene Volumina der lysierten Probe (0,5 µl, 1 µl, 2 µl, 2,5 µl, 4 µl, 8 µl, 16 µl und 24 µl) mit 12,5 µl, 25 µl bzw. 50 µl Luciferase-Assay-Reagent (LAR) gemischt und im Luminometer vermessen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3.18** und graphisch in **Abbildung 3.24** dargestellt.

Tabelle 3.18: Bestimmung der absoluten Luciferaseaktivität unter Verwendung verschiedener Proben- und LAR-Volumina

Volumen Probe [µl]	RLU		
	12,5 µl LAR	25 µl LAR	50 µl LAR
0,5	671	613	961
1	1535	1576	1609
2	2478	2646	2643
2,5	2864	3231	3265
4	3768	4657	4748
8	4640	7173	8274
16	4744	8913	13154
24	4012	9234	15147

RLU = relative light units, LAR = Luciferase-Assay-Reagent

Abbildung 3.24: Graphische Ermittlung des Konzentrationsbereiches, in dem eine lineare Korrelation zwischen Proben- und LAR-Volumen besteht



Dem Verlauf der Kurven in **Abbildung 3.24** kann entnommen werden, dass eine lineare Korrelation von Probenvolumen und Biolumineszenz (RLU) nur bei der Verwendung von 25 bzw. 50 μl LAR und Probenvolumina von 1 bis 4 μl bzw. 1 bis 8 μl vorlag. Daher wurde angenommen, dass bei den angegebenen Verhältnissen von Probe und LAR auch bei dem Vorhandensein größerer Mengen von Luciferase (durch Induktion) noch ausreichend Substrat (Luciferin) zur Umsetzung in ein Biolumineszenzsignal zur Verfügung stand.

In den folgenden Versuchen wurde zur Bestimmung der spezifischen Luciferaseaktivität ein Probenvolumen von 2,5 μl und ein LAR-Volumen von 25 μl eingesetzt.

3.2.2.2.3 Bestimmung der spezifischen Luciferaseaktivität

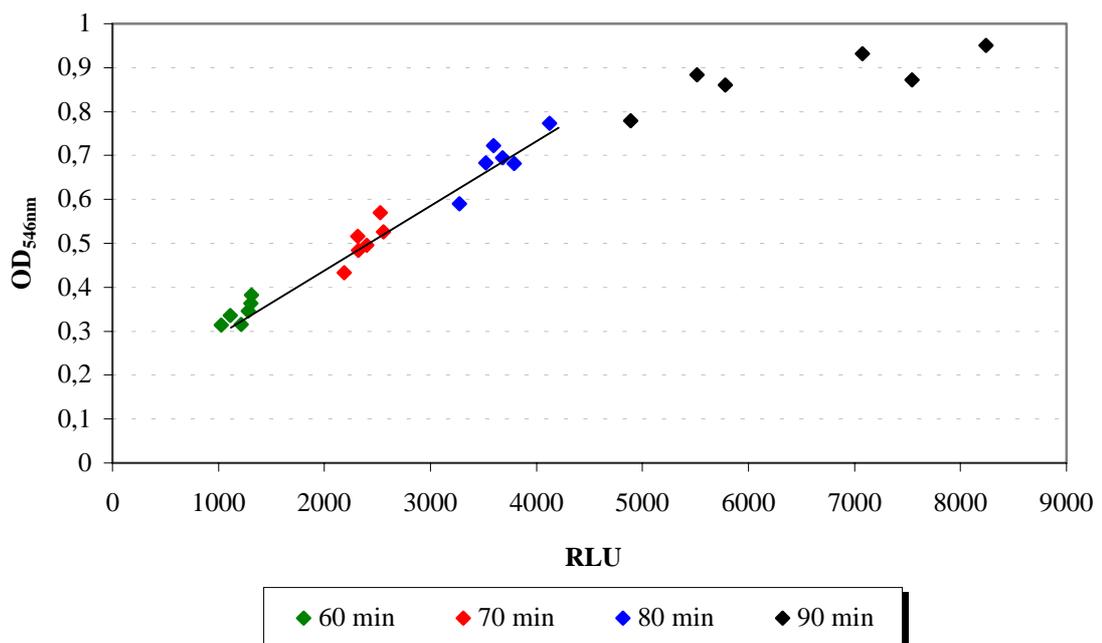
Die spezifische Luciferaseaktivität wurde bestimmt, um Schwankungen der RLU-Werte – insbesondere hervorgerufen durch unterschiedliche Zellzahlen – auszuschließen. Als Bezugsgrößen zu den RLU-Werten können die Proteinmenge, die Lebendzellzahl oder die Trübungsmessung (optische Dichte) einer Probe verwendet werden. Unabhängig

davon welche Bezugsgröße ausgewählt wird, muss zunächst ermittelt werden, ob eine lineare Korrelation der Bezugsgröße zu den RLU-Werten besteht.

In dieser Arbeit wurde die optische Dichte (OD) als Bezugsgröße ausgewählt. In Induktionsversuchen mit Ciprofloxacin sollte die Zunahme der RLU-Werte in Abhängigkeit von der OD untersucht werden. An zwei Versuchstagen wurden je drei Ansätze von *E. coli* WT + pPHB342 (mit LB-Bouillon als Nährmedium) bei Erreichen einer OD_{546nm} von 0,06 bis 0,08 mit einer der 0,25-fachen MHK entsprechenden Ciprofloxacinkonzentration (0,0039 $\mu\text{g/ml}$) versetzt. Die Ansätze wurden für 60, 70, 80 und 90 min weiter inkubiert. Zu diesen Zeitpunkten wurde die OD_{546nm} der Ansätze gemessen, sowie eine Probe für die Messung der Biolumineszenz (RLU) entnommen (90 μl Probe + 10 μl K_2HPO_4 Puffer). Die Zellyse wurde wie unter **2.2.2.10** beschrieben durchgeführt. Jede Probe wurde dreimal im Luminometer gemessen. Für jede Messung wurden 2,5 μl der jeweiligen lysierten Probe mit 25 μl LAR gemischt.

Für die Prüfung, ob ein linearer Zusammenhang von RLU- und OD-Werten besteht, wurden die einzelnen RLU-Werte aus den Versuchen mit den entsprechenden OD-Werten korreliert und graphisch dargestellt (**Abbildung 3.25**).

Abbildung 3.25: Korrelation der RLU- und OD_{546nm} -Messwerte bei der Probenentnahme zu verschiedenen Zeitpunkten



In einem OD_{546nm} -Bereich von 0,3 bis 0,8 (entspricht einer Probenentnahme im Zeitraum von 60 bis 80 min) besteht eine gute lineare Korrelation zwischen OD_{546nm} und RLU-Werten. Über einer OD_{546nm} von 0,8 konnte ein linearer Zusammenhang von OD_{546nm} und RLU nicht mehr nachgewiesen werden (hier wurde vermutlich der Sättigungsbereich der Luciferaseaktivität erreicht).

Erfolgt die Probenentnahme im OD_{546nm} -Bereich von 0,3 bis 0,8 kann die spezifische Luciferaseaktivität durch den Bezug der RLU- auf die OD_{546nm} -Werte ermittelt werden.

3.2.2.2.4 Einfluss von Glucose und Induktionszeit auf die Bestimmung der spezifischen Luciferaseaktivität

Für die Ermittlung eines geeigneten Zeitpunktes für die Probenentnahme zur Bestimmung der spezifische Luciferaseaktivität bzw. *recA*-Induktion wurden Induktionsversuche durchgeführt. Um parallel den Einfluss von Glucose auf die spezifische Luciferaseaktivität untersuchen zu können, wurden die Induktionsversuche abweichend von der unter 3.2.2.2.3 angegebenen Versuchsordnung in LB-Bouillon mit bzw. ohne Glucosezusatz (0,2%) durchgeführt. Im Anschluss an die luminometrische Messung (3.2.2.2.3) wurde die spezifische Luciferaseaktivität einer Probe wie folgt ermittelt:

$$\text{spez. Luciferaseaktivität [RLU/OD}_{546nm}\text{]} = \frac{\bar{x} \text{ Biolumineszenzmess. einer Probe [RLU]}}{\text{OD}_{546nm} \text{ zum Zeitpunkt der Probenentnahme}}$$

Aus den so berechneten spezifischen Luciferaseaktivitäten von drei Parallelansätzen (z.B. Wachstum in LB-Bouillon, Probenentnahme nach 70 min) eines Versuches wurde erneut ein Mittelwert gebildet. **Tabelle 3.20** enthält die Ergebnisse von zwei Versuchstagen.

Tabelle 3.20: Abhängigkeit der *recA*-Induktion von der Induktionszeit (60, 70, 80 bzw. 90 min) und der Verwendung verschiedener Medien in *E. coli* WT + pPHB342

Zeit [min]	Mittelwert der spezifischen Luciferaseaktivität [RLU/OD _{546nm}]					
	Versuch I			Versuch II		
	LB + Glucose	LB	Induktions- erhöhung	LB + Glucose	LB	Induktions- erhöhung
60	2381	3467	46%	2462	3625	47%
70	3553	4756	34%	4193	4729	13%
80	3959	5279	33%	4683	5938	27%
90	4917	6401	30%	5530	8302	50%

Einfluss von Glucose auf die *recA*-Induktion

Bezogen auf die verschiedenen Medien konnte gezeigt werden, dass die *recA*-Induktion in Glucose freiem Medium deutlich höhere Werte annimmt als in einem Medium, das Glucose enthält (Induktionserhöhung um mindestens 13%) (**Tabelle 3.20**). Dieses Ergebnis konnte durch Literaturdaten bestätigt werden (86, 360). Um die Sensitivität des Testassays zu erhöhen, wurde somit in den folgenden Versuchen Glucose freie LB-Bouillon verwendet.

Einfluss der Induktionszeit auf die *recA*-Induktion

Bezogen auf die Versuche in LB-Bouillon konnte gezeigt werden, dass eine Probenahme zwischen 60 und 80 min nach der Induktion mit Ciprofloxacin nur geringe Schwankungen der spezifischen Luciferaseaktivitäten an einem (Einzeldaten nicht gezeigt) bzw. zwei Versuchstagen (**Tabelle 3.20**) zur Folge hatte (gute Reproduzierbarkeit). Dies liegt vermutlich an der guten Korrelation zwischen RLU- und OD_{546nm}-Werten in diesem Zeitbereich (**Abbildung 3.25**). Eine Probennahme 90 min nach der Induktion mit Ciprofloxacin hatte deutliche Schwankungen der spezifischen Luciferaseaktivitäten zur Folge. Zu diesem Zeitpunkt besteht zwischen RLU- und OD_{546nm}-Werten kein linearer Zusammenhang mehr (**Abbildung 3.25**).

Für die Bestimmung der minimalen SOS induzierenden Konzentration (**3.2.3**) wurden die Zellen nach 70 min Induktion mit einem Fluorchinolon geerntet. Da die RecA-Konzentration in der bakteriellen Zelle laut Literatur erst 60 min nach der Induktion messbar ist (383), besteht bei einer zu frühen Zellernte das Risiko, auch viele uninduzierte Zellen zu ernten. Erfolgt die Zellernte erst nach 80 min Induktion, so liegen die

Messwerte am Ende des linearen Korrelationsbereiches (**Abbildung 3.25**). Möglicherweise ist durch das Erreichen der stationären Phase oder durch eine fortgeschrittene Chinolon induzierte Filamentierung der Zellen zu diesem späten Zeitpunkt keine Korrelation mehr zu erhalten.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen der Optimierungsversuche (**3.2.2.2.1** bis **3.2.2.2.4**) wurde ein Standardprotokoll für die anschließende Ermittlung der minimalen SOS induzierenden Konzentration (MSIC) von Fluorchinolonen entwickelt (**2.2.2.11**). Zusätzlich wurden in den Versuchen zur Bestimmung der MSIC drei uninduzierte Ansätze mitgeführt, um den Grundwert der *recA*-Induktion bestimmen zu können. Durch die Korrektur der spezifischen Luciferaseaktivität induzierter Proben um den Mittelwert der spezifischen Luciferaseaktivität der uninduzierten Proben konnte die tatsächliche, nur durch ein Chinolon verursachte *recA*-Induktion bestimmt werden.

3.2.3 Bestimmung der minimalen SOS induzierenden Konzentration von Fluorchinolonen

Die Bestimmung der minimalen SOS induzierenden Konzentration (MSIC) von Pradofloxacin im Vergleich zu Cipro-, Enro-, Marbo- und Moxifloxacin erfolgte mit den pPHB342 tragenden *E. coli* Stämmen WT, WT-4, WT-3-1 und WT-K. Die Versuche wurden dabei unter optimierten Bedingungen (**2.2.2.11**) durchgeführt.

Die Induktionswerte der Testchinolone unter Verwendung subinhibitorischer Konzentrationen sind stammweise in den **Abbildungen 3.26** bis **3.29** dargestellt. Jeder Punkt steht für die gemittelte spezifische Luciferaseaktivität von mindestens fünf Induktionsversuchen mit je einer subinhibitorischen Konzentration eines Fluorchinolons. Die prozentuale Streuung der Einzelwerte um den entsprechenden Mittelwert lag dabei jeweils unter 10 %.

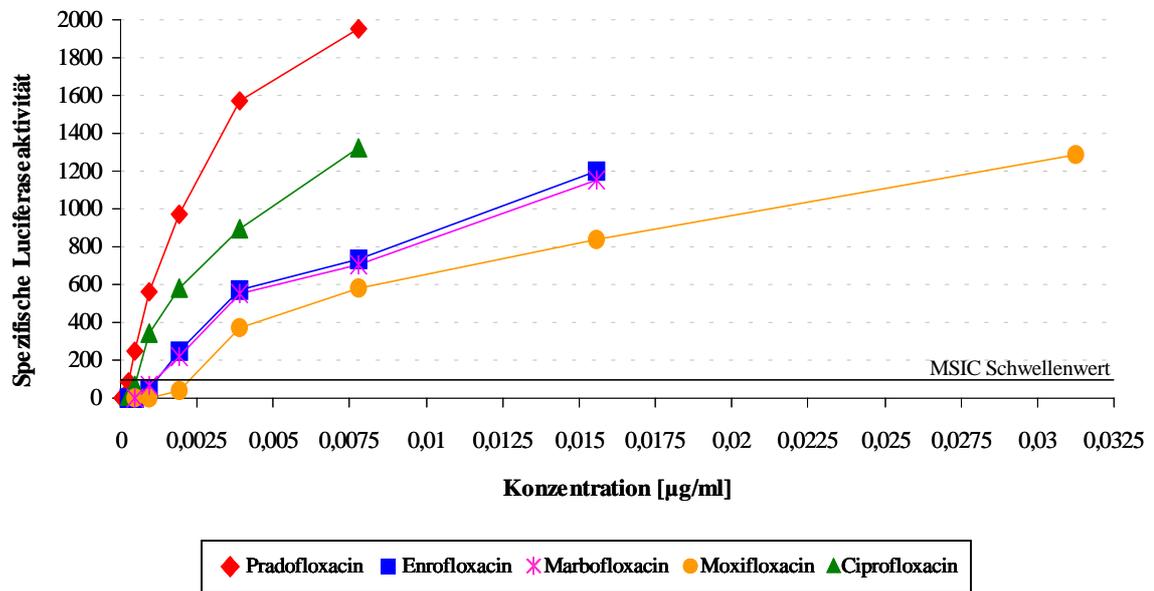
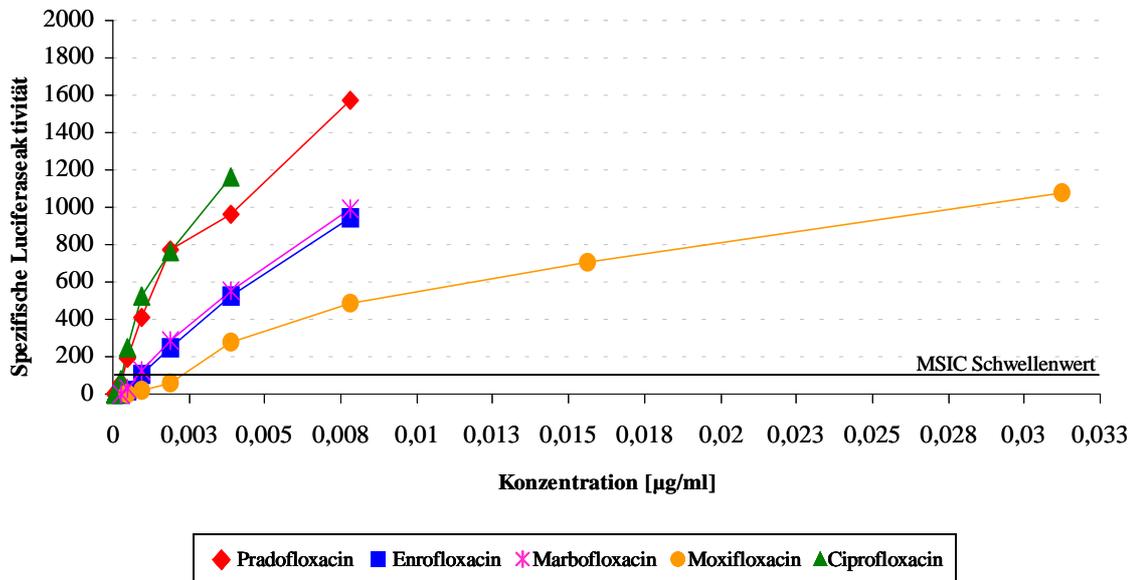
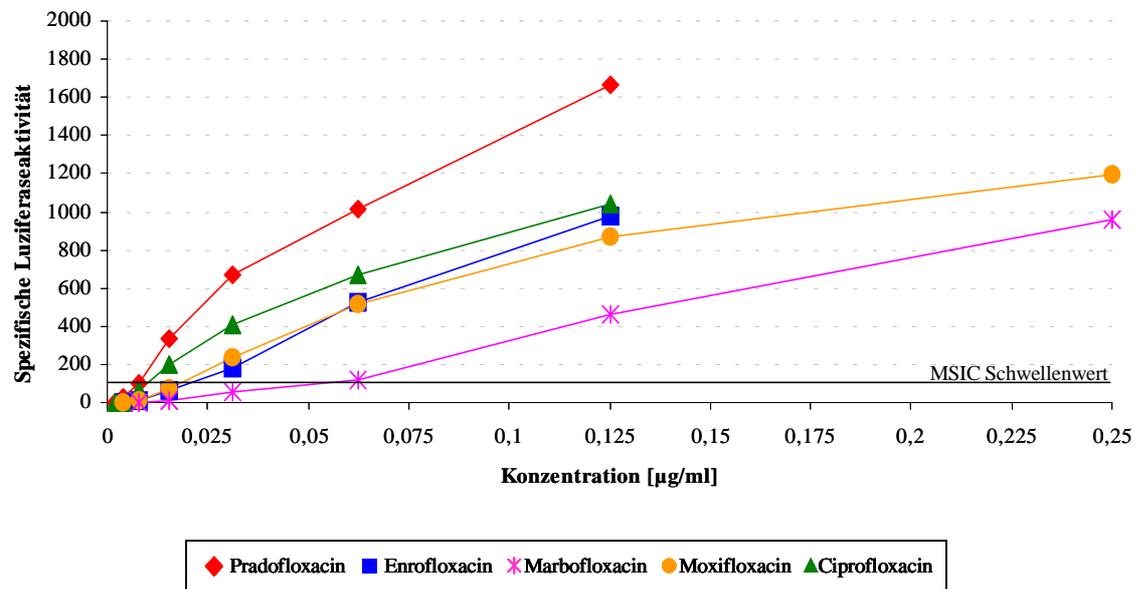
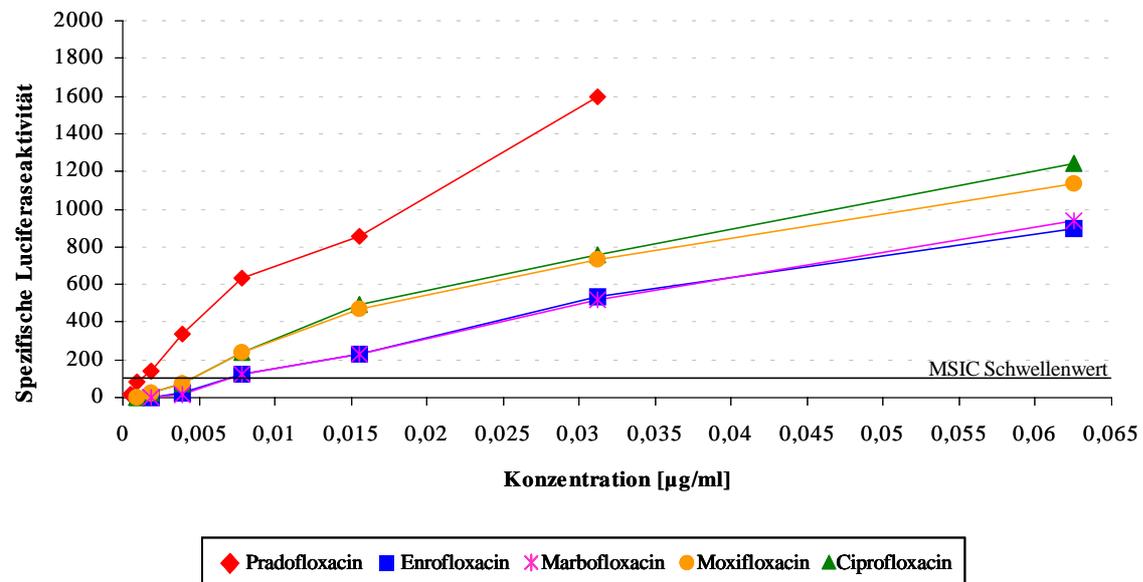
Abbildung 3.26: *recA*-Induktion in *E. coli* WT + pPHB342Abbildung 3.27: *recA*-Induktion in *E. coli* WT-4 + pPHB342

Abbildung 3.28: *recA*-Induktion in *E. coli* WT-3-1 + pPHB342Abbildung 3.29: *recA*-Induktion in *E. coli* WT-K + pPHB342

In allen Stämmen wurde durch Zugabe der Fluorchinolone die Induktion der SOS-Antwort ausgelöst (**Abbildungen 3.26 bis 3.29**). Die Stärke der Induktion war jedoch Stamm-, Chinolon- und Konzentrationsspezifisch. Der schnellste und höchste Anstieg der *recA*-Induktion erfolgte in allen Stämmen durch Pradofloxacin. Unter Verwendung der 0,5-fachen MHK von Pradofloxacin überstiegen die Induktionswerte die der anderen Testchinolone beispielsweise um den Faktor 1,2 bis 1,7.

Die MSIC wurde definiert als die Konzentration, die zu eine Erhöhung der spezifischen Luciferaseaktivität um mindestens 100 RLU/OD_{546nm} (Schwellenwert) im Vergleich zur uninduzierten Kontrolle führte (s. auch Schwellenwert, **Abbildungen 3.26 bis 3.29**). Dieser Schwellenwert bezog sich auf die Schwankungsbreite der spezifischen Luciferaseaktivitäten der drei (in allen Induktionsversuchen mitgeführten) uninduzierten Ansätze (Daten nicht gezeigt).

Die ermittelten MSIC-Werte von Pradofloxacin für alle vier *E. coli* Stämme wurden in den **Tabellen 3.21 bis 3.24** den MSIC-Werten der weiteren Testchinolone gegenübergestellt. Darüber hinaus enthalten die Tabellen Informationen über den Zusammenhang der MSIC- und MHK-Werte der Fluorchinolone.

Tabelle 3.21: MSIC- [pg/ml] und MHK-Werte [µg/ml] von Prado- und Enrofloxacin

FC Stamm	Pradofloxacin			Enrofloxacin		
	MSIC	(x-fache MHK)	MHK	MSIC	(x-fache MHK)	MHK
WT	480	(0,03125)	0,0156	1.900	(0,0625)	0,03125
WT-4	480	(0,03125)	0,0156	950	(0,0625)	0,0156
WT-K	1.900	(0,03125)	0,0625	7.800	(0,0625)	0,125
WT-3-1	15.600	(0,0625)	0,25	31.250	(0,125)	0,25

MSIC = Minimale SOS induzierende Konzentration, FC = Fluorchinolone

Tabelle 3.22: MSIC- [pg/ml] und MHK-Werte [µg/ml] von Prado- und Marbofloxacin

FC Stamm	Pradofloxacin			Marbofloxacin		
	MSIC	(x-fache MHK)	MHK	MSIC	(x-fache MHK)	MHK
WT	480	(0,03125)	0,0156	1.900	(0,0625)	0,03125
WT-4	480	(0,03125)	0,0156	950	(0,0625)	0,0156
WT-K	1.900	(0,03125)	0,0625	7.800	(0,0625)	0,125
WT-3-1	15.600	(0,0625)	0,25	62.500	(0,125)	0,5

MSIC = Minimale SOS induzierende Konzentration, FC = Fluorchinolone

Tabelle 3.23: MSIC- [pg/ml] und MHK-Werte [µg/ml] von Prado- und Ciprofloxacin

FC Stamm	Pradofloxacin			Ciprofloxacin		
	MSIC	(x-fache MHK)	MHK	MSIC	(x-fache MHK)	MHK
WT	480	(0,03125)	0,0156	950	(0,0625)	0,0156
WT-4	480	(0,03125)	0,0156	480	(0,0625)	0,0078
WT-K	1.900	(0,03125)	0,0625	7.800	(0,0625)	0,125
WT-3-1	15.600	(0,0625)	0,25	15.600	(0,0625)	0,25

MSIC = Minimale SOS induzierende Konzentration, FC = Fluorchinolone

Tabelle 3.24: MSIC- [pg/ml] und MHK-Werte [µg/ml] von Prado- und Moxifloxacin

FC Stamm	Pradofloxacin			Moxifloxacin		
	MSIC	(x-fache MHK)	MHK	MSIC	(x-fache MHK)	MHK
WT	480	(0,03125)	0,0156	3.900	(0,0625)	0,0625
WT-4	480	(0,03125)	0,0156	3.900	(0,0625)	0,0625
WT-K	1.900	(0,03125)	0,0625	7.800	(0,0625)	0,125
WT-3-1	15.600	(0,0625)	0,25	31.250	(0,0625)	0,5

MSIC = Minimale SOS induzierende Konzentration, FC = Fluorchinolone

Die geringsten MSIC-Werte gegenüber allen vier *E. coli* Stämmen wies Pradofloxacin auf.

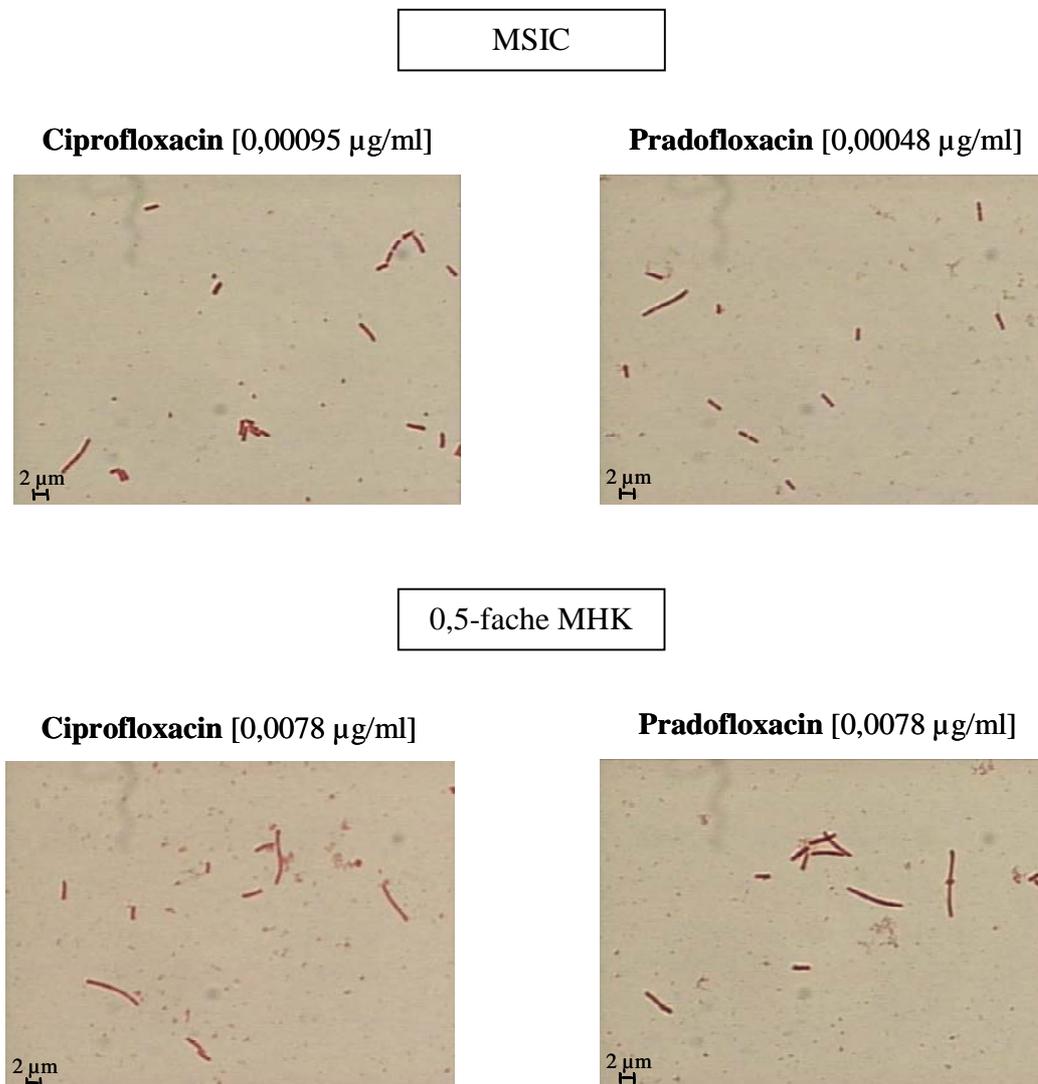
Durch Vergleich der MSIC-Werte aller Fluorchinolone gegenüber Wildtyp- und Mutantstämmen konnte gezeigt werden, dass eine Mutation in Topoisomerase IV (WT-4) im Vergleich zum Wildtyp keine Auswirkungen auf die MSIC hatte. Eine einzelne Mutation in Gyrase (WT-K) hingegen hatte einen Anstieg der MSIC-Werte um das 2- bis 8-fache zur Folge. Bei einer Doppelmutation in Gyrase (WT-3-1) stiegen die MSIC-Werte um das 8- bis 32-fache an. Dies deutet darauf hin, dass die SOS-Antwort in *E. coli* in erster Linie durch Wechselwirkung der getesteten Fluorchinolone mit Gyrase induziert wird.

3.2.4 Filamentierung von *E. coli* Zellen unter Fluorchinoloneinwirkung

Parallel zur Bestimmung der MSIC von Prado- und Ciprofloxacin in *E. coli* WT wurden Proben zur Herstellung mikroskopischer Präparate (2.2.1.7) entnommen. Mit deren Hilfe sollte geklärt werden, ob sich die Zellmorphologie durch die Aktivierung des SOS-Systems mit subinhibitorischen Fluorchinolonzkonzentrationen veränderte. Die Ausbildung von Zellfilamenten beispielsweise lässt sich mit der Induktion des Sfi-Proteins erklären. Dieses Protein gehört (wie RecA) zur SOS-Antwort und ist verantwortlich für die Inhibition der Zellteilung während der DNA-Reparatur (150).

Neben Versuchen mit subinhibitorischen Konzentrationen von Prado- und Ciprofloxacin (jeweils MSIC und 0,5-fache MHK) wurden Untersuchungen mit einer inhibitorischen Konzentration (1-fache MHK) durchgeführt. Die Induktionsdauer in Versuchen mit subinhibitorischen Konzentrationen betrug 70 min, in Versuchen mit der einfachen MHK 70 min bzw. 3 h. Zellen, die unter den jeweiligen Bedingungen ein Längenwachstum über 2 μm (durchschnittliche Länge einer unbehandelten *E. coli* Zelle) aufwiesen, galten als filamentiert.

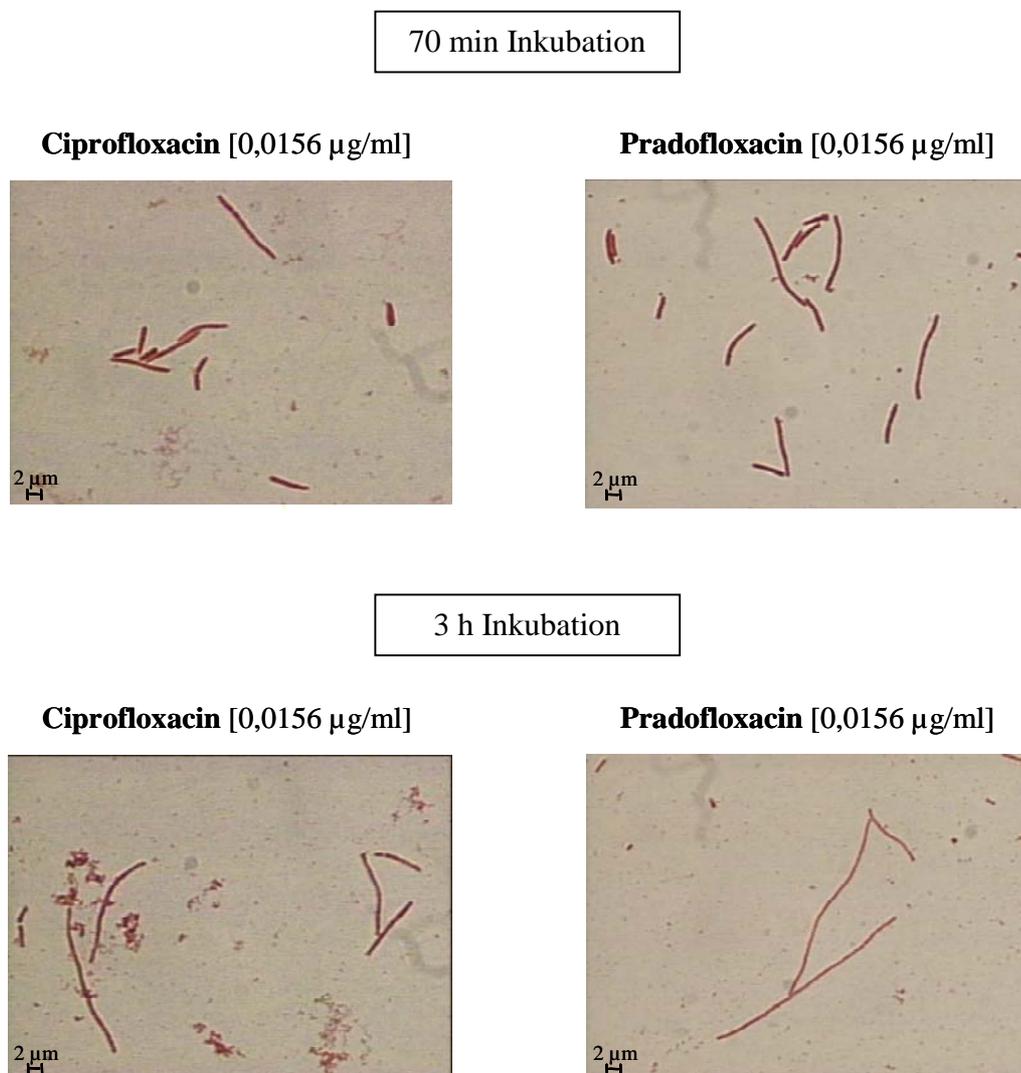
Abbildung 3.30: Filamentierung von *E. coli* WT Zellen nach Inkubation mit subinhibitorischen Fluorchinolonkonzentrationen



Alle Ansätze enthielten filamentierte *E. coli* WT Zellen (**Abbildung 3.30**). Der Grad der Filamentierung bzw. die Anzahl der filamentierten Zellen hing dabei, wie die *recA*-Induktion, vom jeweiligen Fluorchinolon und der eingesetzten Konzentration ab. Eine beginnende Filamentierung der Zellen konnte bereits mit der jeweiligen MSIC von Prado- bzw. Ciprofloxacin beobachtet werden. Eine Behandlung mit der 0,5-fachen MHK resultierte in einer fortgeschrittenen Filamentierung. Dabei wiesen mit Pradofloxacin behandelte Zellen jedoch einen höheren Filamentierungsgrad auf als mit Ciprofloxacin behandelte Zellen. D.h. mit Pradofloxacin lag die Anzahl der filamentierten Zellen bei 67%, mit Ciprofloxacin bei 41%. Das Längenwachstum der Zellen im Vergleich zu un-

induzierten Zellen nahm dabei etwa in gleichem Maße für Prado- bzw. Ciprofloxacin (durchschnittlich 3-fach bzw. 2-fach, maximal 4-fach bzw. 3,25-fach) zu. Für diese Resultate wurden in 30 verschiedenen Einstellungen des jeweiligen Präparates die filamentierten Zellen gezählt und zu der Zahl der unfilamentierten Zellen in Beziehung gesetzt. Das Ausmaß des Längenwachstums wurde mit Hilfe eines Messokulars im Vergleich zu einer uninduzierten Kontrolle bestimmt.

Abbildung 3.31: Filamentierung von *E. coli* WT Zellen nach unterschiedlicher Inkubationszeit in Anwesenheit von Cipro- bzw. Pradofloxacin in einer der jeweiligen MHK entsprechenden Konzentration



Nach 70 min Behandlung der Zellen mit Cipro- bzw. Pradofloxacin in einer der jeweiligen MHK entsprechenden Konzentration zeigten bereits 64% der mit Ciprofloxacin und

86% der mit Pradofloxacin behandelten Zellen ein charakteristisches Längenwachstum. Das Längenwachstum der einzelnen Zellen nahm mit Pradofloxacin durchschnittlich um das 4-fache (maximal um das 7-fache), mit Ciprofloxacin um das 3-fache (maximal um das 5-fache) im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu. Bei Verlängerung der Induktionszeit von 70 min auf 3 h wurden fast ausschließlich filamentierte Zellen gefunden (97% mit Pradofloxacin, 88% mit Ciprofloxacin). Auch die Zelllänge nahm weiter zu. Mit Pradofloxacin behandelte Zellen wiesen im Vergleich zu uninduzierten Zellen eine im Durchschnitt 8-fache (maximal 10-fache), mit Ciprofloxacin behandelte Zellen eine 5-fache (maximal 7-fache) Verlängerung auf.

3.2.5 Bestimmung der minimalen SOS induzierenden Konzentration von Fluorchinolonmetaboliten

In einem weiteren Induktionsversuch sollte gezeigt werden, ob sich der in dieser Arbeit entwickelte Luciferasetestassay (s. 2.2.2.11) auch zur Bestimmung der antibakteriellen Restaktivität von Chinolonmetaboliten eignet. Dazu wurde exemplarisch ein Metabolit des Fluorchinolons Enrofloxacin – Enrofloxacin-N-4'-oxid (MHK 32 µg/ml) – getestet. Enrofloxacin-N-4'-oxid entsteht beim Abbau von Enrofloxacin in Basidomyceten (401).

Abbildung 3.32: *recA*-Induktion in *E. coli* WT + pPHB342 durch Enrofloxacin-N-4'-oxid

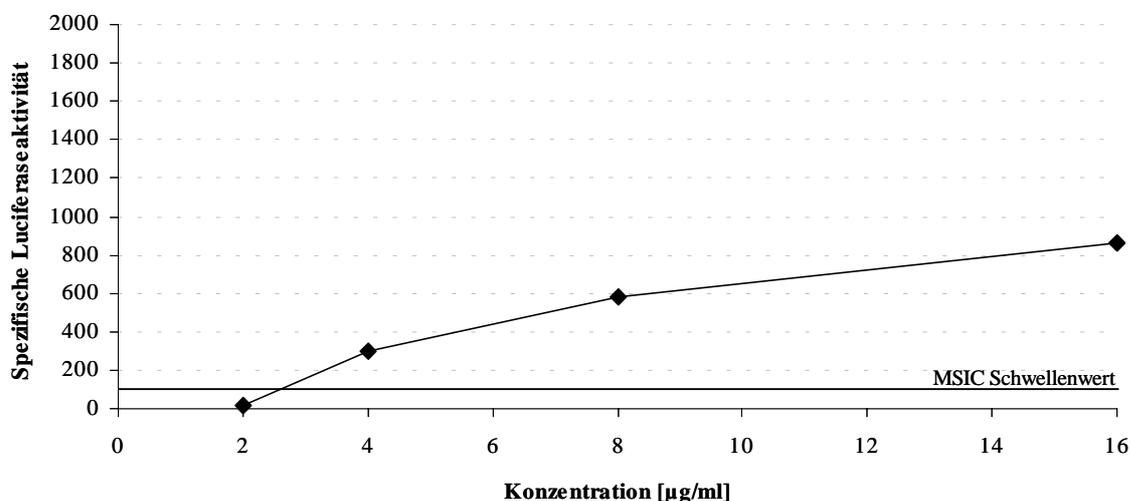
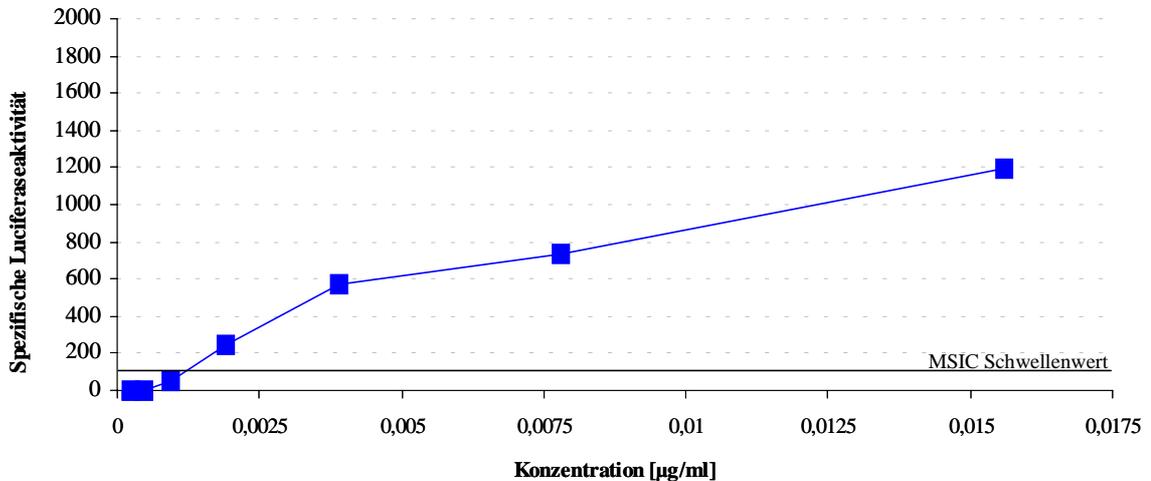


Abbildung 3.33: *recA*-Induktion in *E. coli* WT + pPHB342 durch Enrofloxacin

Enrofloxacin-N-4'-oxid induzierte ebenfalls die *recA*-Genexpression (**Abbildung 3.32**). Das Ausmaß der *recA*-Induktion hervorgerufen durch den Metaboliten war jedoch deutlich geringer als durch Enrofloxacin (**Abbildung 3.33**). Z.B. lagen die spezifische Luciferaseaktivitäten für Enrofloxacin-N-4'-oxid in einer der 0,5-fachen MHK entsprechenden Konzentration (16 µg/ml) um den Faktor 1,4 niedriger als mit Enrofloxacin in einer der 0,5-fachen MHK entsprechenden Konzentration (0,0156 µg/ml).

In **Tabelle 3.25** ist der ermittelte MSIC-Wert von Enrofloxacin-N-4'-oxid dem Wert von Enrofloxacin gegenübergestellt. Darüber hinaus enthält die Tabelle Informationen über den Zusammenhang der MSIC- und MHK-Werte der Fluorchinolone.

Tabelle 3.25: MSIC-Werte [pg/ml] von Enrofloxacin-N-4'-oxid und Enrofloxacin

FC Stamm	Enrofloxacin-N-4'-oxid			Enrofloxacin		
	MSIC	(x-fache MHK)	MHK	MSIC	(x-fache MHK)	MHK
WT	4.000.000	(0,125)	32	1.900	(0,0625)	0,03125

MSIC = Minimale SOS induzierende Konzentration, FC = Fluorchinolon

Verglichen mit der MSIC von Enrofloxacin (1.900 pg/ml) lag die MSIC von Enrofloxacin-N-4'-oxid (4.000.000 pg/ml) um das 2.105-fache höher (**Tabelle 3.25**). Wurde der MSIC-Wert von Enrofloxacin-N-4'-oxid zu dem von Enrofloxacin in Beziehung gesetzt, so konnte eine antibakterielle Restaktivität des Fluorchinolonmetaboliten von 0,047% ermittelt werden.

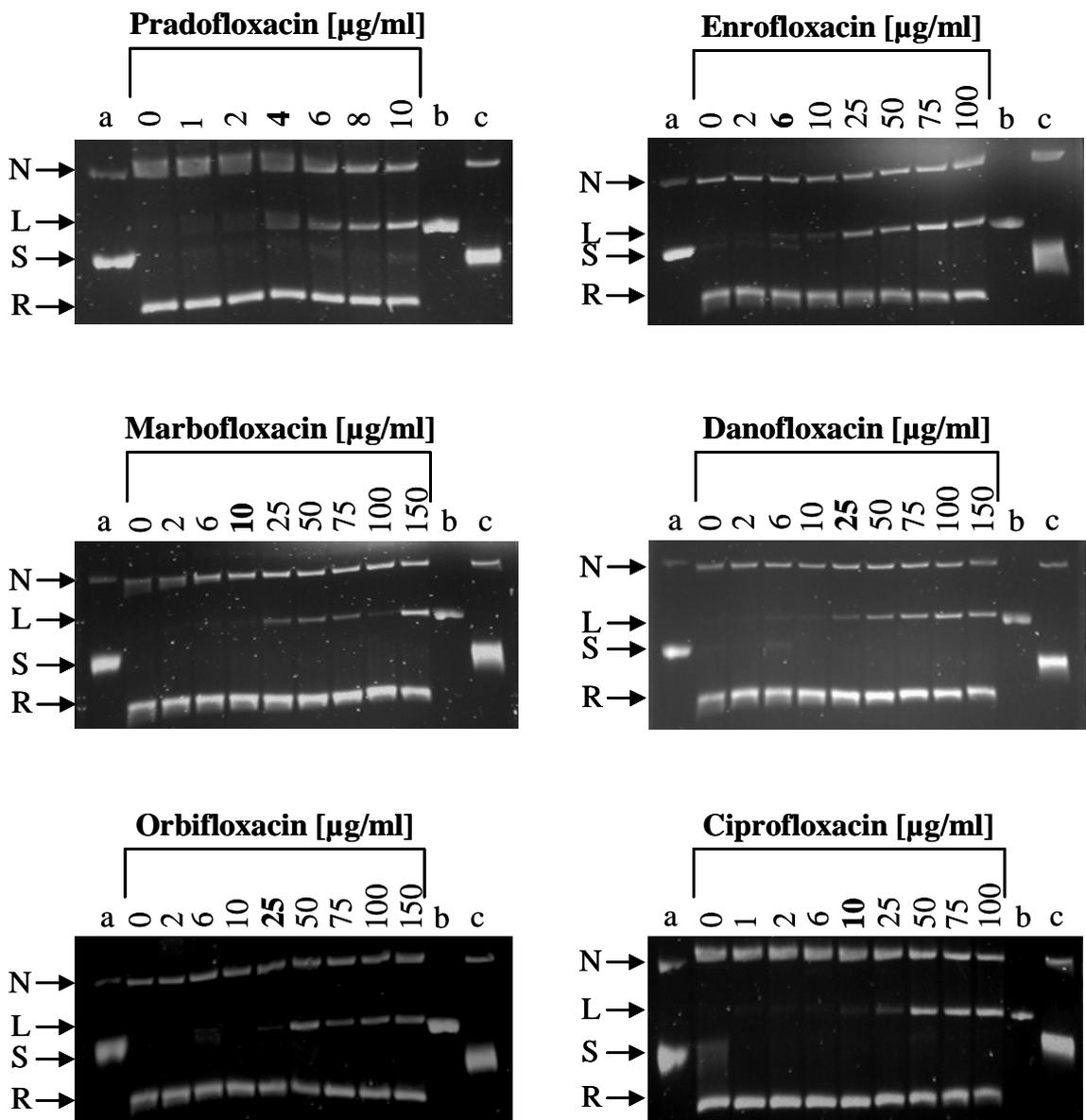
3.2.6 Wechselwirkung von Fluorchinolonen mit humaner Topoisomerase II

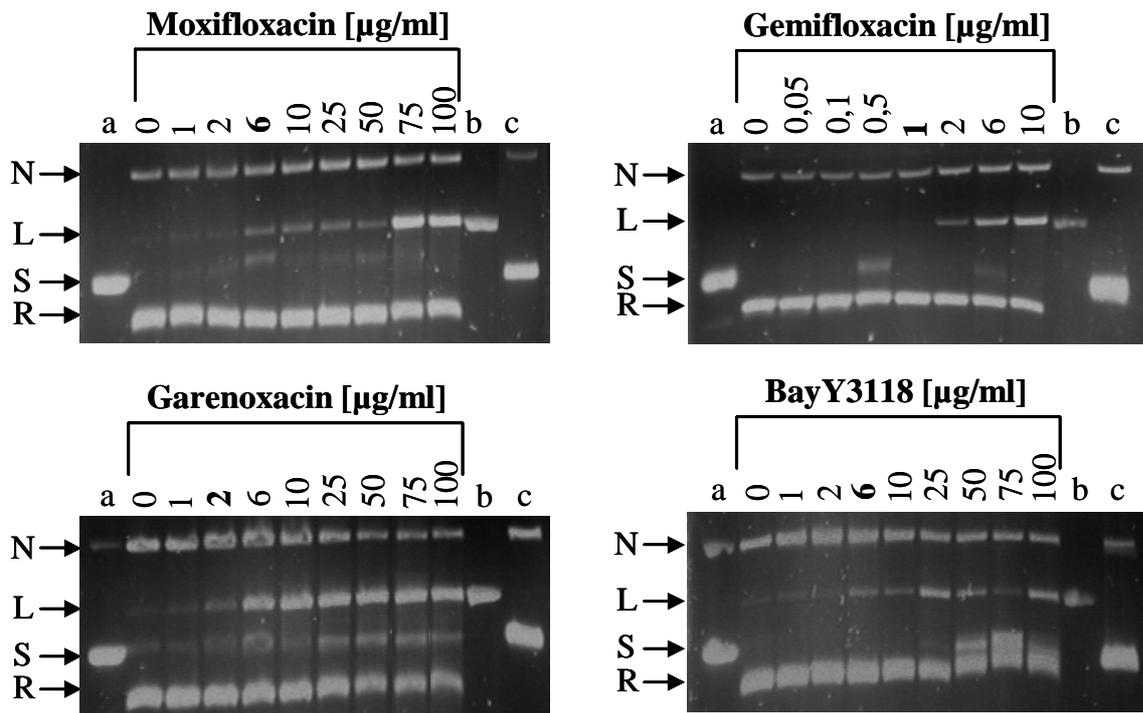
Die humane Topoisomerase II gehört wie Gyrase und Topoisomerase IV zu den Typ II-Topoisomerasen. Im Gegensatz zu den prokaryontischen Enzymen, die aus einem Heterotetramer bestehen (2GyrA/2GyrB bzw. 2ParC/2ParE) ist die humane Topoisomerase II als Homodimer aufgebaut (55). Trotz dieser strukturellen Unterschiede ändert die humane Topoisomerase II, wie Gyrase und Topoisomerase IV, die DNA-Topologie durch Einführen eines DNA-Doppelstrangbruchs, einer DNA-Strangpassage und der anschließenden Religation des Doppelstrangbruchs. Vergleicht man die Aminosäuresequenz dieser drei Enzyme, so weisen verschiedene Regionen, wie die ATPase-, die DNA-Bindungs- und die DNA-Cleavage-Domäne, starke Homologien zueinander auf (55, 217). Da Fluorchinolone mit Gyrase und Topoisomerase IV im Bereich der DNA-Bindungs- und DNA-Cleavage-Domäne interagieren, ist auf Grund der starken Homologien theoretisch auch eine Interaktion mit humaner Topoisomerase II möglich. Eine Stabilisierung eines Komplexes aus humaner Topoisomerase II und DNA durch Fluorchinolone würde den Untergang der eukaryontischen Zelle zur Folge haben, da die humane Topoisomerase II essentiell für das Überleben der Zelle ist (393). Bevor neue Fluorchinolone zur Behandlung von Infektionen zugelassen werden, ist es daher notwendig die Targetselektivität dieser Substanzen zu untersuchen. Für den Vergleich der Affinität von Fluorchinolonen zu humaner Topoisomerase II und *E. coli* Gyrase wurde in der vorliegenden Arbeit der Cleavage-Assay verwendet. Mit diesem Testsystem ist es möglich, bereits geringe Fluorchinolonzentralen zu ermitteln, die Interaktionen von Fluorchinolonen mit humaner Topoisomerase II anzeigen. Diese Konzentrationen liegen dabei weit unterhalb der Konzentrationen zur Inhibierung der Enzymaktivität (Überspiralisierung bei Gyrase, Relaxierung bei humaner Topoisomerase II).

Mit Hilfe des Cleavage-Assays wurde unter Verwendung gereinigter, humaner Topoisomerase II die Fähigkeit von Pradofloxacin zur Stabilisierung von Enzym-DNA-Komplexen ermittelt und anschließend mit anderen Fluorchinolonen verglichen. Als Substrat für die humane Topoisomerase II wurde überspiralisierte pBR322-DNA verwendet. Die Cleavage-Reaktionen wurden nach einem in dieser Arbeit entwickelten Standardprotokoll durchgeführt (2.2.2.12.3). Die Auftrennung der Cleavage-Proben erfolgte anhand von Agarosegelen (**Abbildung 3.34**). Mit Hilfe eines Densitometers wurde die Intensität der Bande analysiert, die – pro Fluorchinolonzentralen – dem

Cleavage-Produkt (linearisierte DNA) entsprach (7.3, *Tabellen 7.21 bis 7.30*). Die Konzentration eines Fluorchinolons, die eine Zunahme des Cleavage-Produkts um $10 (\pm 3)$ Prozent im Vergleich zur Antibiotikum freien Kontrolle zur Folge hatte, wurde als minimale Cleavage-Konzentration bezeichnet (CC_{10}). Der CC_{10} -Wert ist in den folgenden Abbildungen für jede Substanz besonders hervorgehoben.

Abbildung 3.34: Fluorchinolon induzierter DNA-Cleavage mit humaner Topoisomerase II





Hervorgehobene Zahlen = CC_{10} -Werte, a = Substratkontrolle (unbehandelte, überspiralisierte Plasmid-DNA, b = Cleavage-Kontrolle (lineare Plasmid-DNA), c = Spezifitätskontrolle (Cleavage-Ansatz mit Chinolon in der jeweils höchsten verwendeten Konzentration, jedoch ohne humane Topoisomerase II), N = nicked DNA, L = lineare DNA, S = überspiralisierte DNA, R = relaxierte DNA

Mit allen Fluorchinolonen konnte eine lineare Zunahme des Cleavage-Produkts mit steigender Fluorchinolonzkonzentration beobachtet werden. Ein Cleavage-Produkt in Abwesenheit von humaner Topoisomerase II wurde nicht detektiert (s. **Abbildung 3.34**, Spezifitätskontrolle c).

Zum Vergleich der Selektivität wurden die bereits unter **3.2.1** aufgeführten CC_{10} -Werte für Gyrase genutzt und den hier bestimmten CC_{10} -Werten für die humane Topoisomerase II in **Tabelle 3.26** gegenübergestellt. Die CC_{10} -Werte der Fluorchinolone in Cleavage-Assays mit humaner Topoisomerase II lagen in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 25 $\mu\text{g/ml}$, in Cleavage-Assays mit Gyrase von 0,005 bis 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Die Substanzen sind somit bezogen auf die Cleavage-Aktivität 100 bis 5.000mal selektiver für Gyrase als für die humane Topoisomerase II.

Tabelle 3.26: Benötigte Fluorchinolonkonzentrationen zur Stabilisierung von *E. coli* Gyrase- bzw. humane Topoisomerase II-DNA-Komplexen

Fluorchinolon	CC ₁₀ [µg/ml]		Faktor
	Gyrase	Topoisomerase II	
Pradofloxacin	0,005	4	800
Enrofloxacin	0,005	6	1200
Marbofloxacin	0,005	10	2000
Danofloxacin	0,005	25	5000
Orbifloxacin	0,005	25	5000
Ciprofloxacin	0,005	10	2000
Moxifloxacin	0,01	6	600
Gemifloxacin	0,01	1	100
Garenoxacin	0,01	2	200
BayY3118	0,005	6	1200

CC₁₀ = Konzentration, die einen ersten detektierbaren Cleavage hervorruft

4. Diskussion

Bei der Entwicklung neuer potenter Chinolone stehen neben guten pharmakokinetischen und -dynamischen Parametern mehrere Eigenschaften – bezogen auf die Wirksamkeit einer Substanz – im Vordergrund: ein breites antibakterielles Spektrum, eine gute Hemmwirkung auf beide Zielstrukturen, Gyrase und Topoisomerase IV (dual-targeting), die Wirkung auf Erreger in unterschiedlichen physiologischen Stadien, eine geringe Fähigkeit zur Selektion resistenter Bakterien und die Wirkung auf Bakterien mit Resistenzmutationen (72, 213, 426). Um das Risiko von Nebenwirkungen während einer Therapie zu verringern, sollten Chinolone darüber hinaus eine möglichst hohe Selektivität für prokaryontische Topoisomerasen im Vergleich zu eukaryontischen Topoisomerasen aufweisen.

Generell wird zur Ermittlung der antibakteriellen Wirksamkeit von Chinolonen die minimale Hemmkonzentration bestimmt. Dieser Parameter besagt jedoch weder etwas über den Wirkungstyp eines Chinolons noch über die bevorzugte Zielstruktur, die Fähigkeit zur Selektion resistenter Bakterien oder die Aktivität der Substanz auf eukaryontische Topoisomerasen. Eine möglichst genaue Charakterisierung der Aktivität eines Chinolons erfordert somit die Bestimmung verschiedener Parameter. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Aktivität von Pradofloxacin, einem neuen C8-Cyanofluorchinolon, auf pro- und eukaryontische Topoisomerasen mit bekannten sowie neu entwickelten mikro- und molekularbiologischen Methoden bestimmt.

4.1 Vergleichende mikrobiologische Untersuchungen zur Bestimmung der Wirkung von Pradofloxacin auf zellulärer Ebene

Der Effekt von Pradofloxacin auf lebende Zellen wurde mit Hilfe von Empfindlichkeitsbestimmungen, Selektionsversuchen und Absterbekinetiken untersucht. Hierdurch sollten Erkenntnisse über die Aktivität der Substanz gegenüber sensiblen und resistenten Bakterien, über den Wirkungstyp und das Potential zur Selektion resistenter Bakterien gewonnen werden. Die Untersuchungen erfolgten mit Stämmen von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius*, da diese drei Species zu den häufigsten Infektionserregern in der

Human- bzw. Veterinärmedizin zählen. Alleine im veterinärmedizinischen Bereich werden 41,0% der bakteriellen Infektionen durch *S. intermedius*, 30,7% durch *E. coli* und 6,7% durch *S. aureus* verursacht (77).

E. coli gehört zur Normalflora des Dickdarms von Mensch und warmblütigen Tieren, kann jedoch unter bestimmten Bedingungen (z.B. Dysbiose, mangelnde Hygiene, eingeschränkte Immunabwehr) Infektionen hervorrufen (fakultativ pathogen). Bei extratestinalen Infektionen steht *E. coli* als Erreger von Harnwegsinfektionen beim Menschen und bei Haustieren an erster Stelle (46, 334). Des Weiteren kann *E. coli* Wundinfektionen bei Mensch und Tier (46, 382) sowie Appendizitis (Blinddarm-Entzündung) und Sepsis – vorrangig beim Menschen – hervorrufen (46). Leichte bis schwere Durchfallerkrankungen werden durch spezielle *E. coli* Stämme bei Mensch (EHEC = enterohämorrhagisch, ETEC = enterotoxisch, EPEC = enteropathogen, EIEC = enteroinvasiv) und Tier (hauptsächlich EHEC) verursacht (46, 375). *S. aureus* kommt außer beim Menschen bei Säugetieren und vielen Vogelarten als Kommensale vorrangig in den vorderen Nasenpartien und auf der Haut vor (45, 239), gehört jedoch wie *E. coli* zu den fakultativ pathogenen Infektionserregern. Die häufigsten durch *S. aureus* hervorgerufenen Infektionen stellen eitrige Hautinfektionen (Abszesse, Furunkel) sowie die Mastitis dar (45, 239, 257, 387). Unbehandelt können alle oberflächlichen und tieferen Prozesse zur Sepsis führen (45, 239). Beide Bakterienspecies – *E. coli* und *S. aureus* – spielen darüber hinaus in der Humanmedizin als Erreger von nosokomialen Infektionen (Infektionen, die bei hospitalisierten Patienten als Komplikation des Grundleidens auftreten) eine große Rolle. Die Verbreitung geschieht in der Regel durch das Personal, durch mangelnde Hygiene oder unzureichende Sterilisation von Geräten. Die *Staphylococcus* Species *S. intermedius* kommt natürlicherweise nur bei Tieren vor (auf der Haut und an den vorderen Nasenpartien) und ist somit nur veterinärmedizinisch von Bedeutung (11, 12). Eine häufig durch *S. intermedius* hervorgerufene Hauterkrankung bei Hunden und Kleintieren, wie z.B. Kaninchen, stellt die Pyodermie dar (119, 242, 286, 352). Die Gefährdung des Tieres durch diese eitrige Hautinfektion rangiert dabei von leicht bis lebensbedrohend (152).

4.1.1 Effekt von Pradofloxacin auf Wildtyp- und Mutantenstämme häufiger Infektionserreger

Die Aktivität von Pradofloxacin, sowie der Fluorchinolone BayY3118, Cipro-, Moxi-, Enro- und Marbofloxacin gegenüber ausgewählten, genetisch definierten Stämmen von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* wurde zunächst durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration ermittelt. Zur Bewertung der klinischen Empfindlichkeit der Stämme gegenüber den getesteten Fluorchinolonen wurden alle ermittelten MHK-Werte mit den vorgegebenen Referenzwerten der CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) für Ciprofloxacin (sensibel: $MHK \leq 1$, intermediär: $MHK = 2$, resistent: $MHK \geq 4$) verglichen (260). Für die übrigen hier getesteten Fluorchinolone gab es keine Referenzwerte.

4.1.1.1 Aktivität von Pradofloxacin gegenüber Wildtypstämmen und definierten Topoisomerasemutanten von *E. coli*

Aus **Tabelle 3.1 (3.1.1)** geht hervor, dass sowohl der Wildtypstamm *E. coli* WT als auch die Topoisomerasemutanten WT-2 (einfache Mutation in *gyrA*), WT-3-1 (doppelte Mutation in *gyrA*) und WT-4 (einfache Mutation in *parC*) klinisch sensibel ($MHK \leq 1$) gegenüber allen getesteten Fluorchinolonen waren. BayY3118, Cipro- und Pradofloxacin erwiesen sich dabei als geringfügig aktiver (0,0156 bis 0,25 µg/ml) als Moxi-, Enro- und Marbofloxacin (0,03125 bis 0,5 µg/ml). Abgesehen davon zeigten alle Fluorchinolone im Vergleich zum Wildtyp höhere MHK-Werte gegenüber den Gyrasemutanten WT-2 (0,0626 bis 0,25 µg/ml) und WT-3-1 (0,0626 bis 0,25 µg/ml) als gegenüber der Topoisomerase IV-Mutante WT-4 (0,0078 bis 0,03125 µg/ml). Diese Daten weisen darauf hin, dass die getesteten Fluorchinolone in *E. coli* bevorzugt mit Gyrase interagieren und in geringerem Maße mit Topoisomerase IV (21, 129, 177). In Versuchen von Schedletzky et al. konnte dies ebenfalls für Clina-, Trova-, Grepa- und Levofloxacin gezeigt werden. Die MHK-Werte für eine Mutante mit einer *gyrA*-Mutation lagen hier mindestens um das 4-fache höher als die MHK-Werte für eine Mutante mit einer *parC*-Mutation (329).

4.1.1.2 Aktivität von Pradofloxacin gegenüber definierten, hochresistenten *E. coli* Stämmen mit Topoisomerasemutationen und einer verringerten Fähigkeit zur Akkumulation von Fluorchinolonen

Zur weiteren Untersuchung der Wirksamkeit der Fluorchinolone wurden die MHK-Werte gegenüber *E. coli* MII-M19, MIII-300/16 und 4917-M-C1 bestimmt. Diese Stämme weisen zusätzlich zu Mutationen in den Genen *gyrA* und *parC* Insertions- oder Deletionsmutationen in den Genen von direkten (*acrR*) oder indirekten regulatorischen Elementen (*marO*, *marR*) der Genexpression der AcrAB-Effluxpumpe auf (**Tabelle 3.1**). Bei den Mutanten MII-M19 und MIII-300/16 liegen Deletionen im Gen *marR* vor, das für das Repressorprotein MarR codiert (131, 232, 335). 4917-M-C1 weist eine Deletion im Gen *acrR* auf (codiert für das Repressorprotein AcrR) und besitzt darüber hinaus eine Insertion im Operatorbereich des Mar-Locus, *marO*. MarR unterbindet im funktionsstüchtigen Zustand durch Bindung an *marO* die Expression der Gene *marA* und *marB* (9, 230, 231). Studien belegen, dass Deletionsmutationen in *marR* zu einem funktionsuntüchtigen Repressor führen und dass Insertionen in *marO* die Bindung eines funktionsfähigen Mar-Repressors verhindern können (222, 267). Beides führt zur konstitutiven Expression der *marRAB*-Gene (18, 66). Dabei stellt MarA einen Transkriptionsaktivator dar, der unter anderem die Expression der Gene *acrAB* für die AcrAB-Effluxpumpe positiv reguliert (9, 336, 366). Durch dauerhafte Expression des Aktivators wird das Effluxpumpensystem konstitutiv exprimiert. Ein direktes Kontrollelement des *acrRAB*-Operons stellt der Repressor AcrR dar. Deletionen im Gen für dieses Regulatorprotein führen ebenfalls zu einer konstitutiven Expression der AcrAB-Effluxpumpe (218). Neben der positiven Regulation der Gene für die AcrAB-Effluxpumpe besitzt der Transkriptionsaktivator MarA auch eine negative regulatorische Funktion auf die Synthese von Porinen, wie OmpF, was letztendlich in einer Verringerung der Anzahl von OmpF-Porinen in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien resultiert (67, 143). Beide Ereignisse, die Verringerung von OmpF-Porinen und die gesteigerte Expression der AcrAB-Effluxpumpe, führen auf Grund einer verminderten Akkumulation von Fluorchinolonen in der Zelle zu einer verringerten Empfindlichkeit.

Aus **Tabelle 3.1** kann entnommen werden, dass die untersuchten Fluorchinolone in ihrer Aktivität deutliche Unterschiede gegenüber den hochresistenten *E. coli* Stämmen MII-M19, MIII-300/16 und 4917-M-C1 (Targetmutationen, verminderte Porinbildung und

erhöhter Efflux) aufwiesen. Alle Stämme waren resistent gegenüber Moxi-, Enro- und Marbofloxacin (MHK-Werte lagen zwischen 4 und 8 µg/ml). Gegenüber Ciprofloxacin erwies sich MII-M19 als vermindert empfindlich (MHK-Wert lag bei 2 µg/ml). Die Stämme MIII-300/16 und 4917-M-C1 (besitzen im Gegensatz zu MII-M19 zusätzlich zu den Mutationen mit einem Einfluss auf die Fluorchinolonakkumulation mehr als eine Topoisomerasemutation) waren klinisch resistent gegenüber Ciprofloxacin (MHK-Werte bei 8 µg/ml). BayY3118 erwies sich als aktivstes Fluorchinolon, da alle Stämme klinisch sensibel gegenüber dieser Substanz waren (MHK-Werte von 0,25 bis 1 µg/ml). Die MHK-Werte von Pradofloxacin gegenüber den Mutanten MII-M19 und 4917-M-C1 lagen ebenfalls im klinisch sensiblen Bereich (jeweils 1 µg/ml). Mutante MIII-300/16 erwies sich als vermindert empfindlich gegenüber Pradofloxacin (MHK-Wert betrug 2 µg/ml). Die unterschiedliche Aktivität der getesteten Fluorchinolone auf die hochresistenten Stämme kann auf mehreren Faktoren beruhen. BayY3118 und Pradofloxacin sind schlechte Substrate für die AcrAB-Effluxpumpe (wichtigstes Effluxpumpensystem in *E. coli*). So konnten Pestrova et al. zeigen, dass ein Pyrrolidinopiperidinring an C7 auf Grund seiner Größe und hydrophoben Eigenschaften ein schlechtes Substrat für Effluxpumpen darstellt (290). Sowohl BayY3118 als auch Prado- und Moxifloxacin besitzen einen solchen Substituenten (s. **1.2, Tabelle 1.4**). Da Moxifloxacin jedoch eine geringere Aktivität gegenüber den Stämmen MII-M19, MIII-300/16 und 4917-M-C1 aufweist, scheint neben dem C7-Substituenten noch ein anderer Faktor für die gesteigerte Aktivität von BayY3118 und Pradofloxacin verantwortlich zu sein. Z.B. könnten die unterschiedlichen C8-Substituenten hier eine Rolle spielen. Eine weitere mögliche Erklärung für die hohe Aktivität von BayY3118 und Pradofloxacin berücksichtigt die Wechselwirkung von Fluorchinolonen mit OmpF-Porinen bzw. die erleichterte Passage der äußeren Membran gramnegativer Bakterien (56, 396). Eine Verminderung der Anzahl von OmpF-Porinen führt beispielsweise zu einer reduzierten Empfindlichkeit für Cipro- und Norfloxacin (16, 67, 140). Nach Untersuchungen von Mitsuyama et al. sind jedoch Tosu- und Sparfloxacin weiterhin aktiv gegenüber OmpF-Porin-defizienten Stämmen (245). Mitsuyama et al. schlossen daraus, dass Tosu- und Sparfloxacin die äußere Membran gramnegativer Bakterien leichter passieren können als andere Chinolone. Da generell alle Chinolone durch die Komplexbildung von Mg²⁺-Ionen (verbinden benachbarte Lipopolysaccharidmoleküle der äußeren Membran) mit Hilfe der 3-Carboxy-4-Oxo-Gruppe zur Destabilisierung der Lipopolysaccharidschicht beitragen und

somit die äußere Membran durchdringen können (56), muss eine erleichterte Passage einzelner Substanzen durch anderen Faktoren, wie z.B. dem 2,4-Difluorphenyl-Substituenten von Tosufloxacin, beeinflusst werden. Übertragen auf die unterschiedliche Aktivität von BayY3118, Prado- und Moxifloxacin gegenüber den hier getesteten hochresistenten Stämmen ist denkbar, dass der C8-Cl- bzw. C8-CN-Substituent von BayY3118 bzw. Pradofloxacin im Gegensatz zum C8-OCH₃-Substituenten von Moxifloxacin für eine erleichterte Passage der äußeren Membran eine Rolle spielt.

4.1.1.3 Aktivität von Pradofloxacin gegenüber Wildtypstämmen und definierten Topoisomerasemutanten von *S. aureus* und *S. intermedius*

Anhand der MHK-Ergebnisse aus **Tabelle 3.2 (3.1.1)** kann gezeigt werden, dass Cipro-, Enro- und Marbofloxacin eine gute, BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin eine exzellente Wirkung auf die Wildtypstämme *S. aureus* ATCC 6538 und *S. intermedius* ATCC 29663 besitzen. Konsekutive Mutationen in den Genen für Topoisomerase IV und Gyrase von *S. aureus* hatten eine schrittweise Erhöhung der MHK-Werte für alle getesteten Fluorchinolone zur Folge. Diese Beobachtung geht konform mit den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen (98, 99, 264). Das Ausmaß der MHK-Erhöhung war für die einzelnen Fluorchinolone unterschiedlich (**Tabelle 3.2**). Gegenüber der Topoisomerase IV-Mutante Q48.1.2-1 mit einem Aminosäureaustausch an Position 84 in der GrlA-Untereinheit zeigten BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin die höchste Aktivität (MHK-Werte lagen bei 0,0625, 0,25 bzw. 0,25 µg/ml). Einen guten Effekt besaß Enrofloxacin (MHK-Wert betrug 1 µg/ml). Die MHK-Werte von Cipro- und Marbofloxacin (je 2 µg/ml) konnten im klinisch intermediären Bereich eingeordnet werden. Eine zusätzliche Mutation an Position 84 in der GyrA-Untereinheit von Gyrase führte bei Cipro-, Enro- und Marbofloxacin zum Verlust der Aktivität gegenüber Mutante Q24.2.5-3 (MHK-Werte bei 16-64 µg/ml). Diese Mutante war hingegen klinisch empfindlich gegenüber BayY3118 (MHK-Wert betrug 1 µg/ml) und vermindert empfindlich gegenüber Moxi- und Pradofloxacin (MHK-Werte lagen jeweils bei 2 µg/ml). Die relativ hohe Aktivität von BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin auf beide Topoisomerasemutanten lässt darauf schließen, dass diese Substanzen sowohl mit Topoisomerase IV als auch mit Gyrase interagieren (dual-targeting). In erster Linie scheinen hierbei die C8-

Substituenten von Bedeutung zu sein. So konnte in früheren Studien mit Moxifloxacin und anderen C8-substituierten Fluorchinolonen nachgewiesen werden, dass die jeweiligen C8-Substituenten für die Erweiterung des Wirkungsspektrums auf den grampositiven Bereich sowie für die Aktivität auf beide Zielenzyme eine Rolle spielen (31, 36, 64, 95, 96, 158, 159, 212, 301, 425). Zhao et al. konnten darüber hinaus in Untersuchungen mit verschiedenen Fluorchinolon-Derivaten zeigen, dass Derivate mit einer Methoxygruppe an C8 weniger durch Aminosäurevariationen in Gyrase und Topoisomerase IV in ihrer Wirkung beeinträchtigt wurden als Derivate ohne C8-Substitution (425). Lu et al. boten eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen an. Hiernach reduzieren Resistenzmutationen den elektronenreichen Charakter der α 4-Helix – der postulierten Erkennungsregion der Fluorchinolone in GyrA (212, 248, 291). Die C8-Substituenten moderner Fluorchinolone sind nach Lu et al. bedeutsam für den Wiederaufbau eines elektronenreichen Milieus, so dass eine Hemmung von Gyrase wieder möglich ist (213). Auf Grund der hohen Aktivität von BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin gegenüber den Topoisomerasemutanten ist eine ähnliche Interaktion mit den mutierten Zielenzymen möglich. Darüber hinaus könnte auch der C7-Pyrrolidinopiperidinring dieser drei Fluorchinolone wichtig für die gesteigerte Aktivität sein, da dieser Substituent mit einem verringerten Austransport (s. auch 4.1.1.2) aus der bakteriellen Zelle in Verbindung gebracht wird.

4.1.2 Bevorzugte Zielstruktur und Selektionspotential von Pradofloxacin

Resistenz gegenüber Fluorchinolonen kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden: a) Mutationen in den Genen der bakteriellen Typ II-Topoisomerasen, Gyrase und Topoisomerase IV, b) eine Verringerung der Substanzkonzentration in der Zelle und c) durch Plasmid vermittelte Resistenz (126, 318). Während bisher nur wenige Berichte über Plasmid vermittelte Fluorchinolonresistenz existieren (233, 367, 368) und dieser Mechanismus zur Zeit noch eine zahlenmäßig untergeordnete Rolle spielt, stellen Mutationen in den Genen der Untereinheiten von Gyrase (*gyrA* und *gyrB*) und Topoisomerase IV (*parC* und *parE*) sowie eine verringerte Akkumulation der Substanzen in der Zelle – durch erhöhten Efflux bzw. eine verringerte Porinsynthese – die Hauptursachen für das Auftreten klinisch resistenter Bakterienstämme dar (126, 318).

Auf Grund des vermehrten Auftretens resistenter Bakterien während der Behandlung mit älteren Fluorchinolonen, wie Cipro- und Levofloxacin (5, 354), sollten neue Fluorchinolone ein möglichst geringes Potential zur Selektion resistenter Bakterien aufweisen (154). In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Potential von Pradofloxacin zur Selektion resistenter Bakterien untersucht. Des Weiteren sollten durch die Versuche Hinweise auf die bevorzugte Zielstruktur (Gyrase oder Topoisomerase IV) dieser Substanz in *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* gewonnen werden. D.h. treten spontane Mutationen in der bevorzugten Zielstruktur auf, so verringert sich deren Empfindlichkeit gegenüber der zu testenden Substanz, während die Empfindlichkeit der anderen Zielstruktur unverändert bleibt.

4.1.2.1 Bevorzugte Zielstruktur von Pradofloxacin in *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius*

Die in dieser Arbeit mit Prado- und Enrofloxacin selektierten *E. coli* Mutanten wiesen Veränderungen in der GyrA- bzw. GyrB-Untereinheit von Gyrase auf (3.1.2, **Tabelle 3.5**). Dies weist auf Gyrase als bevorzugte (primäre) Zielstruktur der beiden Substanzen in *E. coli* hin. Auf Grund der Ergebnisse früherer Selektionsversuche mit *E. coli* bzw. anderen gramnegativen Bakterien (z.B. *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spec.*) stellt Gyrase auch für andere Fluorchinolone wie Cipro- oder Moxifloxacin die bevorzugte Zielstruktur dar (88, 115, 145, 177, 237, 318). Alle in der vorliegenden Arbeit identifizierten *gyrA*-Mutationen waren in der Chinolonresistenz-determinierenden Region (QRDR) dieser Untereinheit lokalisiert. Diese Region stellt einen Bereich dar, in dem häufig Resistenzmutationen gegenüber Fluorchinolonen nachgewiesen wurden (70, 133, 258, 270). In der GyrA-Untereinheit von *E. coli* umfasst die QRDR die Aminosäuren 67 bis 106 (415). Sechs der neun mit Enro- und Pradofloxacin selektierten Mutanten von *E. coli* WT wiesen einen Aminosäureaustausch von Serin zu Leucin an Position 83 auf, zwei einen Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin an Position 87. Beide Mutationen sind aus mehreren vorhergehenden Studien bekannt (68, 70, 94, 103, 123, 132, 133, 270, 284, 318, 321, 350, 415, 416). Darüber hinaus trug eine mit Pradofloxacin selektierte Mutante (WT-K) einen Aminosäureaustausch in GyrB von Serin zu Tyrosin an Position 464. Diese Mutation erwies sich als stabil, da WT-K nach mehreren Anti-

biotikum freien Passagen auf der ursprünglichen Selektionskonzentration wieder anwuchs (Methode s. **2.2.1.10**). Der entsprechende Aminosäureaustausch in GyrB wurde bisher nur für ein klinisches Isolat von *S. typhimurium* an Position 463 (114) bzw. von *P. mirabilis* an Position 464 beschrieben (399) und stellt somit eine neue Mutation in *E. coli* dar. Darüber hinaus lag die Mutation außerhalb der ursprünglich definierten QRDR von GyrB (Aminosäuren 426 bis 447) (413), was für eine Erweiterung dieser Region spricht.

Von *S. aureus* ATCC 6538 konnten in der vorliegenden Arbeit nur mit Enrofloxacin resistente Bakterien selektiert werden (**3.1.2, Tabelle 3.3**). Alle Resistenzmutationen waren bekannt (Serin-80 zu Phenylalanin/Tyrosin) und befanden sich in der QRDR von GrlA (Aminosäuren 64 bis 103) (98, 99, 120). Auch die von *S. intermedius* ATCC 29663 selektierten Mutanten wiesen ausschließlich Mutationen in der QRDR von GrlA (Sequenzbereich entsprechend zu *S. aureus*) auf. Die mit Ciprofloxacin selektierten Mutanten zeigten einen Aminosäureaustausch von Serin zu Isoleucin an Position 80 bzw. von Asparaginsäure zu Asparagin an Position 84. Die mit Pradofloxacin selektierte Mutante besaß ebenfalls einen Aminosäureaustausch an Position 84, jedoch wurde hier Asparaginsäure durch Tyrosin ersetzt. Da über Mutationen in *S. intermedius* bislang keine Erkenntnisse vorliegen, kann nur vermutet werden, dass die aufgetretenen Mutationen an Codon 80 vergleichbar mit denen an Codon 80 in *grlA* von *S. aureus* bzw. in *parC* von *E. coli* sind. So wurde in *E. coli* beispielsweise häufig ein Austausch an Position 80 von Serin zu Isoleucin beschrieben (94, 129, 378). Ein Aminosäureaustausch an Position 84 von Asparaginsäure (GAT) zu Asparagin (AAT) oder Tyrosin (TAT) ist für *S. intermedius* spezifisch. Auf Grund des in *E. coli parC* bzw. *S. aureus grlA* vorliegenden Codons GAA für Glutaminsäure ist ein Aminosäureaustausch zu Asparagin oder Tyrosin durch eine einzelne Mutation nicht möglich.

Während Gyrase in gramnegativen Bakterien für alle bislang untersuchten Fluorchinolone die bevorzugte Zielstruktur darstellt, interagieren viele Fluorchinolone in grampositiven Bakterien mit Topoisomerase IV, andere hingegen mit Gyrase. So deuten Untersuchungen mit *S. pneumoniae* beispielsweise darauf hin, dass Cipro- und Trovafloxacin bevorzugt mit Topoisomerase IV, Spar- oder Clinafloxacin bevorzugt mit Gyrase interagieren (255, 279, 280, 281, 316). Die Selektionsversuche der vorliegenden Arbeit mit *S. aureus* bzw. *S. intermedius* deuten auf Topoisomerase IV als bevorzugte Zielstruktur von Enro- bzw. Ciprofloxacin in den beiden grampositiven Species hin. Die mit diesen

Substanzen selektierten *Staphylococcus* Mutanten wiesen ausschließlich Mutationen in *grlA* auf. Topoisomerase IV scheint ebenfalls die bevorzugte Zielstruktur von Pradofloxacin in *S. intermedius* zu sein, da Mutationen nur in *grlA* auftraten. Einen Hinweis auf die primäre Zielstruktur von Pradofloxacin in *S. aureus* liefern Selektionsversuche von H.-G. Wetzstein (400). Hier wurden ebenfalls zuerst Mutationen in *grlA* nachgewiesen, was für Topoisomerase IV als bevorzugte Zielstruktur von Pradofloxacin in *S. aureus* spricht. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen mit weiteren Fluorchinolonen wie Gati- oder Moxifloxacin weisen ebenfalls auf Topoisomerase IV als primäre Zielstruktur in *S. aureus* hin (98, 99, 115, 116, 264).

Die Bestimmung der MHK gegenüber den in dieser Arbeit selektierten Mutanten von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* (**3.1.2, Tabelle 3.6**) ergab, dass die MHK-Werte der C8-substituierten Fluorchinolone BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin im Vergleich zu den Wildtypstämmen nur um das 2- bis 4-fache, die MHK-Werte von Cipro-, Enro- und Marbofloxacin hingegen um das 4- bis 16-fache anstiegen. Ähnliche Ergebnisse ergaben Versuche von Discotto et al. mit Garenoxacin selektierten Erstschriftmutanten (82). Während die MHK-Werte von Ciprofloxacin (kein C8-Substituent) im Vergleich zu den Werten des Wildtypstammes um das 8-fache anstiegen, blieben die MHK-Werte von Garenoxacin (C8-OCHF₂) unverändert. Dieses Ergebnis und die Resultate der vorliegenden Arbeit belegen, dass der C8-Substituent bedeutsam für die antibakterielle Wirkung von Fluorchinolonen ist: a) Hinsichtlich der Erweiterung des Wirkungsspektrums (Wirkung auf gramnegative und -positive Bakterien) und b) in Bezug auf die hohe Aktivität gegenüber Topoisomerasemutanten (s. auch **4.1.1**).

Die Bestimmung der MHK-Werte der Fluorchinolone gegenüber den selektierten Mutanten in Anwesenheit von 32 µg/ml Phenylalanyl-Arginyl-β-Naphtylamid (Inhibitor von RND-Effluxpumpen wie AcrAB in *E. coli*) bzw. 20 µg/ml Reserpin (Inhibitor der NorA-Effluxpumpe in Staphylokokken) ergab keine bzw. nur eine geringe Abweichung von einer Dilutionsstufe (entspricht dem Fehlerbereich der MHK-Bestimmung) zu den MHK-Werten ohne Inhibitoren. Z.B. betrug der MHK-Wert von Pradofloxacin für die mit dieser Substanz selektierten Mutante IP0,06-2d-51 von *S. intermedius* ATCC 29663 ohne Reserpin 0,0625 µg/ml (**3.1.2, Tabelle 3.6**). Die MHK-Werte von Pradofloxacin in Anwesenheit von DMSO (Lösung von Reserpin gelang nur in 25% Dimethylsulfoxid) ohne bzw. mit Reserpin betragen ebenfalls je 0,0625 µg/ml. Auf Grund der schlechten

Löslichkeit von Reserpin ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Substanz während der Inkubationszeit (18 bis 24 h) wieder auskristallisiert und in dieser Form nicht in der Lage ist, die NorA-Effluxpumpe vollständig zu inhibieren. Eine Beteiligung der NorA-Effluxpumpe an der Resistenz der *Staphylococcus* Mutanten kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Für die selektierten *E. coli* Mutanten ist ein erhöhter Efflux wahrscheinlich auszuschließen. Z.B. liegt die MHK von Ciprofloxacin für die Topoisomerase-Efflux-Mutante MII-M19 (*gyrA* Ser83Leu, MarR Δ 175) mit 2 $\mu\text{g/ml}$ (**3.1.1, Tabelle 3.1**) deutlich über den MHK-Werten für die selektierten *E. coli* Mutanten (0,0625 bis 0,0125 $\mu\text{g/ml}$).

4.1.2.2 Selektionspotential von Pradofloxacin

Die in dieser Arbeit ermittelten Mutationsfrequenzen von *E. coli* WT für Pradofloxacin (CN-Gruppe an C8, Pyrrolidinopiperidin an C7) und Enrofloxacin (C8-H, C7-Ethylpiperazin) betragen bei einer der 4-fachen MHK entsprechenden Selektionskonzentration $3,8 \times 10^{-9}$ bzw. $9,4 \times 10^{-10}$ (**3.1.2, Tabelle 3.3**). Im Gegensatz hierzu konnten Schedletzky et al. in Selektionsversuchen mit *E. coli* WT zeigen, dass unter Verwendung der 4-fachen MHK als Selektionskonzentration die Mutationsfrequenz von Moxifloxacin (C8-OCH₃, C7-Pyrrolidinopiperidin) mit $3,8 \times 10^{-10}$ um 1,8 Zehnerpotenzen niedriger lag als die Frequenz von Ciprofloxacin (C8-H, C7-Piperazin) (329).

In den Selektionsversuchen mit *S. aureus* wurde ein Inokulum von ca. 1×10^{10} eingesetzt. Da keine resistenten *S. aureus* Mutanten mit Pradofloxacin selektiert werden konnten, muss die Mutationsfrequenz geringer als der Kehrwert des eingesetzten Inokulums, d.h. kleiner als 1×10^{-10} sein. Die niedrige Mutationsfrequenz spricht für ein geringes Potential von Pradofloxacin zur Selektion resistenter Mutanten von *S. aureus*. Ähnliche Ergebnisse gehen aus Selektionsversuchen verschiedener Arbeitsgruppen mit anderen C8-substituierten Fluorchinolonen und *S. aureus* hervor. Die Substanzen wiesen unter Verwendung der jeweils 4-fachen MHK Mutationsfrequenzen von $< 4,5 \times 10^{-11}$ bis $2,8 \times 10^{-9}$ (Gatifloxacin), $9,1 \times 10^{-10}$ bis $< 1,0 \times 10^{-9}$ (Prenafloxacin), $1,1 \times 10^{-10}$ (Trovafoxacin) bzw. 6×10^{-11} (Moxifloxacin) auf (72, 116, 154, 155). Diese Mutationsfrequenzen waren deutlich geringer als die von Ciprofloxacin ($3,9 \times 10^{-9}$ bis $3,0 \times 10^{-8}$) (98, 154, 155, 329).

In den vorliegenden Versuchen mit *S. intermedius* gelang eine Selektion resistenter Bakterien unter Verwendung der 4- bzw. 8-fachen MHK von Ciprofloxacin. Mit Pradofloxacin gelang eine Selektion nur bei Einsatz der 2-fachen MHK. Dabei betrug die Mutationsfrequenz von Pradofloxacin $3,9 \times 10^{-7}$ (**3.1.2, Tabelle 3.4**). Bei der 4-fachen MHK von Pradofloxacin konnten keine Mutanten mehr selektiert werden. Da in Versuchen mit *S. intermedius* ein Inokulum von ca. 2×10^9 eingesetzt wurde, muss die Mutationsfrequenz geringer als der Kehrwert des eingesetzten Inokulums, d.h. kleiner als 2×10^{-9} sein. Im Gegensatz hierzu betrug die Mutationsfrequenz von Ciprofloxacin bei der 4-fachen MHK $3,2 \times 10^{-6}$. Sie lag damit um ca. 3 Zehnerpotenzen höher als die Mutationsfrequenz von Pradofloxacin bei der 4-fachen MHK und um 1 Zehnerpotenz höher als die Frequenz von Pradofloxacin bei der 2-fachen MHK. Diese Daten weisen somit darauf hin, dass Pradofloxacin ein geringeres Potential zur Selektion resistenter Bakterien von *S. intermedius* besitzt als Ciprofloxacin.

Ein möglicher Grund für das geringe Selektionspotential C8-substituierter Fluorchinolone, wie z.B. Pradofloxacin, könnte die hohe Aktivität gegenüber beiden Zielstrukturen – Gyrase und Topoisomerase IV – sein (426). Die Substanzen sind dadurch nicht nur aktiv gegenüber Wildtypzellen, sondern besitzen auch, wie in der vorliegenden Arbeit mit *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* (s. **4.1.1** und **4.1.2.1**) bzw. in früheren Studien mit *S. aureus* und *Mycobacterien* (85, 156, 158, 181, 184, 329, 425) bereits gezeigt werden konnte, eine erhöhte Aktivität gegenüber Gyrase bzw. Topoisomerase IV Erstschriftmutanten. Die hohe Aktivität C8-substituierter Fluorchinolone wie Pradofloxacin gegenüber Erstschriftmutanten bzw. das daraus resultierende verminderte Selektionspotential könnte dazu beitragen, die Selektion klinisch resistenter Bakterien zu verhindern oder zumindest zu verzögern.

Neben der antibakteriellen Aktivität eines Fluorchinolons spielen auch pharmakokinetische Parameter, wie z.B. die nach einer bestimmten Dosierung erreichte maximale Serumkonzentration (C_{\max}), für die Vermeidung von resistenten Bakterien eine Rolle. Sindler et al. definierten in diesem Zusammenhang die mutant-preventing-concentration (MPC). Die MPC stellt die Konzentration eines Antibiotikums dar, die noch in Lage ist, Resistenzmutationen zu verhindern (343). Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Möglichkeit der Selektion resistenter Mutanten gering ist, wenn die Konzentration eines Antibiotikums im Serum bzw. in infizierten Geweben die MPC dauerhaft übersteigt (343). Zhao et al. grenzten den Konzentrationsbereich, in dem eine Selektion statt-

finden kann, weiter ein und bezeichneten diesen Bereich als mutant-selecting-window (MSW) (424). Dabei stellt die untere Grenze des MSW die MHK empfindlicher Zellen einer Bakterienpopulation dar. Die obere Grenze des MSW ist die MPC, die in der Regel geringfügig höher (ca. 2-fach) als die MHK von Einschrittmutanten liegt (343). Übersteigt die Serumkonzentration die MPC dauerhaft, so werden neben empfindlichen Zellen auch Einschrittmutanten abgetötet. Da die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen schrittweise erfolgt (auf eine erste Mutation z.B. in *E. coli* Gyrase erfolgt bei steigenden Fluorchinolonzkonzentrationen eine zweite Mutation in Topoisomerase IV), würde eine Wildtypzelle somit von vornherein zwei Resistenzmutationen benötigen, um oberhalb der MPC wachsen zu können (424). Eine weitere wichtige Rolle zur Vermeidung resistenter Bakterien scheint der Konzentrationsbereich des MSW zu spielen. Firsov et al. zeigten beispielsweise, dass die MPC-Werte der C8-substituierten Fluorchinolone Moxi- und Gatifloxacin niedriger lagen als die Werte von Fluorchinolonen ohne C8-Substituenten (Cipro- bzw. Levofloxacin) (102). Darüber hinaus näherten sich der MPC- und der MHK-Wert von Moxi- bzw. Gatifloxacin einander an. Die Substanzen besaßen somit ein schmales MSW. Wetzstein und Ochtrup konnten dies ebenfalls für Pradofloxacin zeigen (402). Hier überstieg der MPC-Wert (0,55 µg/ml) von Pradofloxacin den MHK-Wert (0,0625 µg/ml) gegenüber *S. aureus* um das 9-fache. Der MPC-Wert (1,93 µg/ml) von Enrofloxacin lag hingegen um das 31-fache höher als der MHK-Wert (0,0625 µg/ml) dieser Substanz. Das MSW ist dementsprechend schmaler für Pradofloxacin als für Enrofloxacin. Eine Selektion resistenter Mutanten ist mit Pradofloxacin im Gegensatz zu Enrofloxacin nur in einem engen Konzentrationsbereich möglich. In diesem Zusammenhang konnten Fraatz et al. anhand pharmakokinetischer Studien mit Hunden zeigen, dass Pradofloxacin auch bei einer geringen Dosierung von 6 mg/kg Körpergewicht auf Grund seiner guten pharmakokinetischen Eigenschaften ($C_{\max} = 3,33$ mg/ml, $T_{\max} = 1,3$ h, $t_{1/2} = 6,8$ h, $AUC = 19,56$ µg × h/ml) erst nach 12 h in den Bereich des MSW fällt (105). Das bedeutet, dass bei einer zweimaligen Gabe von 6 mg/kg Körpergewicht pro Tag eine Selektion resistenter Bakterien mit Pradofloxacin unwahrscheinlich ist.

4.1.3 Bakterizide Wirkungstypen von Pradofloxacin

Für die Antibiotikaklasse der Chinolone sind vier bakterizide Wirkungstypen bekannt – A, B, B₁ und C (251, 253). Mechanismus A weisen alle Chinolone auf (201, 346). Er setzt neben der aktiven Zellteilung von Bakterien auch das Vorhandensein einer aktiven Proteinbiosynthese voraus (201). Mechanismus A ist der einzige bakterizide Mechanismus älterer Chinolone wie Nalidixin- und Oxolinsäure. Ihre bakterizide Wirkung auf Bakterien wird in flüssigem Nährmedium durch Zugabe von Chloramphenicol (hemmt die Proteinbiosynthese) und unter Mangel an Nährstoffen in PBS (hemmt die Zellteilung) aufgehoben (201, 346). Im Gegensatz zu den älteren Chinolonen können Fluorchinolone zusätzliche Mechanismen besitzen. Z.B. ist Ofloxacin aktiv gegenüber teilungsinaktiven Zellen und Zellen mit einer gehemmten Proteinbiosynthese (202, 348). Smith et al. bezeichneten diesen Effekt als Mechanismus B (202). Für Norfloxacin und Enoxacin konnte Mechanismus C nachgewiesen werden, d.h. diese Substanzen waren aktiv gegenüber teilungsinaktiven Zellen, jedoch nicht gegenüber Bakterien mit gehemmter Proteinbiosynthese (148, 199, 300). Ein weiterer Mechanismus – B₁ – wurde in Versuchen mit Clinafloxacin entdeckt. Diese Substanz tötete Bakterien mit gehemmter Proteinbiosynthese ab, besaß jedoch keinen bakteriziden Effekt auf teilungsinaktive Zellen (198). Das Vorhandensein zusätzlicher bakterizider Mechanismen zu Mechanismus A gilt als vorteilhaft für die Wirkung eines Chinolons. Die Substanz besitzt somit einen Effekt auf Bakterien in unterschiedlichen physiologischen Stadien und daraus resultierend eine höhere bakterizide Aktivität (253). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Pradofloxacin auf Zellen in unterschiedlichen physiologischen Stadien getestet und mit der Wirkung weiterer Fluorchinolone verglichen. Abgesehen von einigen Versuchen mit der 8-fachen MHK wurde vorrangig die optimale bakterizide Konzentration (OBC) der getesteten Chinolone eingesetzt, um einen maximalen bakteriziden Effekt hervorzurufen (201, 252). Zusätzlich wurde mit verschiedenen Topoisomerasemutanten der Einfluss von Mutationen in Gyrase oder Topoisomerase IV auf die bakterizide Aktivität der Fluorchinolone untersucht.

4.1.3.1 Bakterizide Mechanismen von Pradofloxacin

Tabelle 3.9 (3.1.3.2) beinhaltet die identifizierten Mechanismen der in dieser Arbeit getesteten Fluorchinolone gegenüber verschiedenen Wildtypstämmen und Topoisomerasemutanten von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius*.

Die Ergebnisse der Absterbekinetiken mit *E. coli* unter Verwendung der 8-fachen MHK bzw. OBC verdeutlichen, dass alle Fluorchinolone bei beiden Konzentrationen Mechanismus A aufwiesen. Das Auftreten zusätzlicher Mechanismen war konzentrationsabhängig. Beispielsweise besaß Enrofloxacin gegenüber *E. coli* WT nur unter Verwendung der OBC Mechanismus C. Moxi- und Pradofloxacin zeigten bereits bei der 8-fachen MHK Mechanismus C, jedoch nur bei der OBC Mechanismus B. Die Konzentrationsabhängigkeit der bakteriziden Mechanismen wurde auch von Howard in Versuchen mit *E. coli* und Ofloxacin nachgewiesen. Dabei wurde zur Auslösung von Mechanismus C die 8-fache MHK, für Mechanismus B hingegen die 40-fache MHK benötigt (148).

Gegenüber den Wildtypstämmen *E. coli* WT, *S. aureus* ATCC 6538 bzw. *S. intermedius* ATCC 29663 und allen getesteten Topoisomerasemutanten besaßen alle Fluorchinolone – unter Verwendung der OBC – Mechanismus A. Dabei wurden die höchsten Keimzahlreduktionen durch die Fluorchinolone BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin erreicht. Besonders hervorzuheben ist die hohe Aktivität von Pradofloxacin gegenüber *E. coli* WT (**3.1.3.2, Abbildung 3.2**). Die Keimzahl lag nach 3 h Inkubation mit Pradofloxacin bereits unterhalb der Nachweisgrenze (Keimzahlreduktion betrug über 5,86 Zehnerpotenzen).

Von den zusätzlichen Mechanismen B, B₁ und C wird Mechanismus B als effektivster angesehen. Fluorchinolone sind hierdurch in der Lage, ihre Wirkung auf teilungsinaktive Zellen und Zellen mit gehemmter Proteinbiosynthese auszuüben. Mechanismus B konnte für Moxi- und Pradofloxacin bei *E. coli* WT nachgewiesen werden (**3.1.3.2, Tabelle 3.9**). Darüber hinaus zeigten BayY3118, Prado- und Moxifloxacin diesen Mechanismus bei *S. aureus* ATCC 6538 sowie BayY3118 und Pradofloxacin bei *S. intermedius* ATCC 29663. Das Auftreten von Mechanismus B bei Ciprofloxacin ist in der Literatur umstritten. Smith konnte diesen Mechanismus für Ciprofloxacin gegenüber einem Wildtypstamm von *E. coli* nachweisen (349). Im Gegensatz dazu steht die Untersuchung von Gradelski et al. (117). Hier konnte gegenüber zwei verschiedenen

E. coli Wildtypstämmen nur Mechanismus A für Ciprofloxacin nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit zeigte Ciprofloxacin Mechanismus C gegenüber *E. coli* WT. Möglicherweise beruhen die unterschiedlichen Ergebnisse auf methodischen Differenzen. Smith verwendete für seine Testungen Übernachtskulturen (349). In der vorliegenden Arbeit und bei Gradelski et al. wurden logarithmisch wachsenden Zellen für die Versuche eingesetzt. Weiterhin könnte der Einsatz unterschiedlicher Medien, wie NI (diese Arbeit und 349) oder Mueller-Hinton-Bouillon (117) Einfluss auf das Auftreten der bakteriziden Mechanismen haben.

Besitzt ein Fluorchinolon den bakteriziden Mechanismus B, wie es hier für BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin gezeigt werden konnte, ergeben sich daraus Vorteile für eine Therapie. Beispielsweise können persistierende Bakterien (Zellen, die über einen längeren Zeitraum teilungsinaktiv sind und einen reduzierten Metabolismus aufweisen) abgetötet werden (251). Eine Reinfektion, die von solchen Erregern ausgehen kann, wird somit verhindert. Des Weiteren kann Mechanismus B für eine verlangsamte Resistenzentwicklung von Bedeutung sein. So besteht eine Bakterienpopulation in der Regel nicht nur aus teilungsaktiven Zellen, sondern, wie z.B. bei Staphylokokken, auch aus sehr langsam wachsenden Zellen mit einem reduzierten Metabolismus (small colony variants, SCV) (128, 295, 299, 384). Da in der Regel alle teilungsaktiven Zellen durch den Mechanismus A der Chinolone rasch abgetötet werden, wird angenommen, dass resistente Bakterien aus SCVs bzw. aus den oben beschriebenen persistierenden Zellen hervorgehen (104, 251). Letztere Subpopulationen können durch den bei BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin vorhandenen Mechanismus B ebenfalls abgetötet und die Resistenzentwicklung dementsprechend verlangsamt werden. Heinzl und Schmid konnten darüber hinaus nachweisen, dass Mechanismus B von Moxifloxacin für die Abtötung von pathogenen, Biofilm bildenden Bakterien verantwortlich ist (128). Nach Ramon et al. scheint dieser Mechanismus auch für die Aktivität von Fluorchinolonen gegenüber Zellen, die von der logarithmischen Wachstumsphase in die stationäre Phase übergehen, wichtig zu sein (299). Diese Sachverhalte könnten ebenfalls auf BayY3118 und Pradofloxacin zutreffen.

4.1.3.2 Einfluss von Topoisomerasemutationen auf die Anzahl zusätzlicher bakterizider Mechanismen von Pradofloxacin

Mutationen in den Topoisomerasegenen hatten einen Einfluss darauf, welche bakteriziden Mechanismen wirksam waren (3.1.3.2, *Tabelle 3.9*). Dies wurde auch von verschiedenen Arbeitsgruppen in früheren Untersuchungen beobachtet (58, 200). In der vorliegenden Arbeit hatte eine einzelne Mutation in der ParC-Untereinheit von *E. coli* Topoisomerase IV (WT-4) den Verlust von Mechanismus C bei Ciprofloxacin, von Mechanismus B bei Moxi- und Pradofloxacin zur Folge. Moxi- und Pradofloxacin zeigten sich jedoch weiterhin aktiv gegenüber ruhenden Zellen, d.h. sie besaßen den bakteriziden Mechanismus C. Eine doppelte Mutation in der GyrA-Untereinheit von Gyrase (*E. coli* WT-3-1) bewirkte bei allen Fluorchinolonen den Verlust aller Mechanismen bis auf Mechanismus A. Dies weist darauf hin, dass für zusätzliche bakterizide Mechanismen eine unveränderte Gyrase benötigt wird. Jedoch deutet der Verlust von Teilmechanismen gegenüber der *E. coli* Mutante WT-4 – in der Topoisomerase IV mutiert, Gyrase jedoch unverändert vorliegt – darauf hin, dass die Fluorchinolone BayY3118, Moxi-, Prado-, Cipro- und Enrofloxacin zur Ausprägung zusätzlicher Mechanismen auch eine unveränderte Topoisomerase IV benötigen.

In *S. aureus* ging der Erwerb einer einzelnen *grlA*-Mutation (Mutante Q48.1.2-1) mit dem Verlust des Mechanismus B von Moxi- und Pradofloxacin einher. Die Fluorchinolone besaßen jedoch (wie Enrofloxacin) noch Mechanismus B₁. Für Cipro- und Marbofloxacin konnte nur Mechanismus A nachgewiesen werden. Die Wirkung von BayY3118 wurde nicht beeinträchtigt. Diese Substanz besaß wie für den Wildtypstamm *S. aureus* ATCC 6538 Mechanismus B. Durch eine zusätzliche Mutation in *gyrA* (Mutante Q24.2.5-3) wurde die bakterizide Aktivität der getesteten Fluorchinolone nicht weiter beeinträchtigt (Beibehalten vorhandener Mechanismen). Z.B. besaßen Moxi- und Pradofloxacin, aber auch Enro- und Marbofloxacin, weiterhin Mechanismus B₁ zusätzlich zu Mechanismus A. Das höhere bakterizide Potential von Moxi- und Pradofloxacin gegenüber Mutante Q24.2.5-3 wird bei Betrachtung der für die Absterbekinetiken eingesetzten optimalen bakteriziden Konzentrationen (3.1.3.1, *Tabelle 3.8*) erkennbar. So benötigten Enro- und Marbofloxacin höhere Konzentrationen (512 µg/ml bzw. 256 µg/ml) für die Ausprägung von Mechanismus A und B₁ als Moxi- und Pradofloxacin (jeweils 128 µg/ml).

4.1.3.3 Mögliche molekulare Effekte für das Auftreten bakterizider Mechanismen

Unabhängig davon, welchen zusätzlichen Mechanismus ein in dieser Arbeit getestetes Fluorchinolon besaß, fiel die Keimzahlreduktion durch die Mechanismen B, B₁ oder C stets geringer aus als die Keimzahlreduktion durch Mechanismus A (3.1.3.2, *Abbildungen 3.2 bis 3.11*). Beispielsweise besaß Pradofloxacin gegenüber *E. coli* WT zusätzlich zu Mechanismus A Mechanismus B, der sich aus den Teilmechanismen B₁ und C zusammensetzt. Im Vergleich zur Keimzahlreduktion um mehr als 5,86 Zehnerpotenzen in NI-Bouillon (Mechanismus A) betrug die Keimzahlreduktion in PBS (Mechanismus C) nur 4,37 Zehnerpotenzen und in NI-Bouillon mit Zusatz von Chloramphenicol [50 µg/ml] (Mechanismus B₁) nur 3,15 Zehnerpotenzen (3.1.3.2, *Abbildung 3.2*). Die variierende Reduktion der Keimzahl durch die verschiedenen Mechanismen konnte bereits in früheren Untersuchungen mit unterschiedlichen Bakterienspecies und Chinolonen gezeigt werden (148, 346, 349). Für die maximale Wirkung eines Chinolons bzw. Fluorchinolons sind somit teilungsaktive Zellen mit einer aktiven Proteinsynthese (entspricht Mechanismus A) notwendig (201, 346, 349). Dies kann damit begründet werden, dass in teilungsaktiven Zellen gleichzeitig mehrere Replikationsgabeln aktiv sind. Durch die Kollision der Replikationsgabeln mit Chinolon-Topoisomerase-DNA-Komplexen (ternäre Komplexe) kommt es zum Stop der Replikation, zur Stabilisierung ternärer Komplexe und zur Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (88). Die bakterizide Wirkung der Chinolone beruht auf der Freisetzung der gespaltenen DNA aus den ternären Komplexen, da die DNA-Läsion ein Signal für eine Reihe zellulärer Reaktionen (SOS-Reparatur, Autolysine) darstellt, welche letztendlich zu einem raschen Bakterientod führen (88, 203, 385). Da die Doppelstrangbrüche jedoch von den gehemmten Topoisomerasen bedeckt werden, wird angenommen, dass ein Proteinfaktor (der bisher noch nicht identifiziert werden konnte) für die Freisetzung der DNA-Enden erforderlich ist (88, 201). Sowohl für die Produktion dieses Proteinfaktors als auch der SOS-Reparatur-Enzyme und Autolysine wird eine aktive Proteinbiosynthese benötigt. Wird die Proteinbiosynthese gehemmt, z.B. durch Chloramphenicol, wird die Freisetzung der DNA-Enden aus den ternären Komplexen und die Induktion der SOS-Antwort verhindert. Dennoch besitzen einige Fluorchinolone die Fähigkeit (wenn auch in geringerem Umfang), Zellen mit einer gehemmten Proteinbiosynthese abzutöten. Dies wird mit dem durch diese Substanzen unterschiedlich stark induzierten Zerfall der ternären Komplexe

und somit mit den strukturellen Eigenschaften der jeweiligen Fluorchinolone in Verbindung gebracht. Zhao et al. stellten dazu die These auf, dass der C8-Substituent weniger zur Stabilität als vielmehr zur Labilität eines Fluorchinolone-Topoisomerase-DNA-Komplexes beiträgt (426). Somit würde ein solcher Komplex leichter zerfallen und Doppelstrangbrüche würden freigelegt. Da bei einer Hemmung der Proteinbiosynthese die Reparatur der DNA-Läsionen durch neu gebildete Proteine nicht möglich ist, wird vermutet, dass durch die Anhäufung von Doppelstrangbrüchen die Anzahl von DNA-Fragmenten steigt und das Genom dadurch irreversibel geschädigt wird (347). Die Wirkung einiger Fluorchinolone auf teilungsinaktive Zellen ist möglicherweise auf eine verbliebene, geringe Transkriptionsaktivität zurückzuführen (305), da auch die Kollision der RNA-Polymerase mit ternären Chinolon-Topoisomerase-DNA-Komplexen eine Schädigung der DNA (Doppelstrangbruch) verursacht (407). Bisher ist nicht bekannt, wodurch der bakterielle Zelltod teilungsinaktiver Zellen letztendlich hervorgerufen wird. Es ist jedoch denkbar, dass auf Grund der Notwendigkeit einer aktiven Proteinbiosynthese für die durch Mechanismus C hervorgerufene antibakterielle Wirkung von Fluorchinolonen neu synthetisierte Proteine am Zelltod beteiligt sind.

Über die Auswirkung von Topoisomerasemutationen auf die den bakteriziden Mechanismen zu Grunde liegenden molekularen Effekte kann nur spekuliert werden. So scheint Mechanismus B im Falle von BayY3118, Pradoxin und Moxifloxacin von einer unveränderten Topoisomerase IV und weniger von einer unveränderten Gyrase abhängig zu sein, da dieser Mechanismus im Vergleich zum *E. coli* Wildtyp WT bereits bei der Topoisomerase IV-Mutante WT-4 fehlt. Dies würde bedeuten, dass diese Fluorchinolone bei einer gehemmten Proteinbiosynthese im Wildtyp bevorzugt zur Labilität von Topoisomerase IV-DNA-Komplexen und nicht von Gyrase-DNA-Komplexen beitragen. Komplexe mit Topoisomerase IV würden hierdurch leichter zerfallen als solche mit Gyrase. Mechanismus C, der bei *E. coli* WT-4 beobachtet wurde, weist auf eine stärkere Bindung der Fluorchinolone an eine unveränderte Gyrase hin. Teilungsinaktive Zellen dieses Stammes werden demnach durch das Aufeinandertreffen von RNA-Polymerase mit stabilen Gyrase-DNA-Komplexen irreversibel geschädigt. Das Vorhandensein einer Doppelmutation in Gyrase (*E. coli* WT-3-1) führt zum Verlust von Mechanismus C. Eine Bindung der Fluorchinolone an Gyrase ist offensichtlich nicht mehr möglich. Der verbliebene Mechanismus A muss daher auf eine Hemmung der in WT-3-1 unverändert (keine Mutation) vorliegenden Topoisomerase IV zurückzuführen sein.

Ein anderer Sachverhalt liegt bei den *S. aureus* Mutanten Q48.1.2-1 (Topoisomerase IV-Mutante) und Q24.2.3-5 (Topoisomerase IV-/Gyrase-Mutante) vor. Während beispielsweise Prado- und Moxifloxacin im Wildtypstamm *S. aureus* ATCC 6538 Mechanismus B aufweisen, ist bei den beiden Topoisomerasemutanten nur Mechanismus B₁ nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass diese Fluorchinolone in Zellen mit gehemmter Proteinbiosynthese zur Labilität sowohl von Topoisomerase IV- als auch von Gyrase-DNA-Komplexen beitragen. Für die Ausprägung des Mechanismus C wäre eine stabilere Bindung notwendig.

4.2 Vergleichende molekularbiologische Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität von Pradofloxacin

Ergänzend zu den mikrobiologischen Untersuchungen, in denen die Aktivität von Pradofloxacin gegenüber verschiedenen Bakterienarten ermittelt wurde, sollten mit Hilfe der molekularbiologischen Untersuchungen die molekularen Ereignisse, welche der bakteriziden Aktivität von Pradofloxacin bzw. anderen Fluorchinolonen zu Grunde liegen, bestimmt werden. Die Arbeiten konzentrierten sich dabei auf zwei molekulare Mechanismen: a) Die Fixierung von DNA-Doppelstrangbrüchen, welche als Intermediate im Rahmen des enzymatischen Reaktionsmechanismus der Typ II-Topoisomerasen entstehen, und b) die Induktion der SOS-Antwort, welche in vivo durch die DNA-Läsionen ausgelöst wird. Die Konzentrationen verschiedener Fluorchinolone, die zur Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen in Anwesenheit bakterieller Typ II-Topoisomerasen ausreichen, wurden in In-vitro-Tests (Cleavage-Assays) mit isolierter Gyrase bzw. Topoisomerase IV ermittelt. Im Gegensatz dazu ist die Bestimmung der zur Induktion der SOS-Antwort erforderlichen Konzentrationen nur in vivo möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein sensitives In-vivo-Testsystem (*precA-luc*-Reporterassay) entwickelt. Anhand der Ergebnisse der In-vitro- bzw. In-vivo-Bestimmungen wurden die Fluorchinolone hinsichtlich ihrer Aktivitäten miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde die inhibitorische Aktivität der Fluorchinolone auf humane Topoisomerase II – mit Hilfe des In-vitro-Tests (Cleavage-Assay) – untersucht. Durch den Vergleich der Ergebnisse aus den Cleavage-Assays mit Gyrase bzw. humaner Topoisomerase II sollte

eine mögliche unerwünschte Wirkung der Substanzen – insbesondere von Pradofloxacin – auf eukaryontische Enzyme abgeschätzt werden.

4.2.1 Wechselwirkung von Pradofloxacin mit isolierten prokaryontischen Zielstrukturen

Zur Bestimmung der Aktivität von Chinolonen auf bakterielle Zielstrukturen – Gyrase und Topoisomerase IV – können verschiedene In-vitro-Assays eingesetzt werden. Dabei wird zwischen katalytischen und nicht-katalytischen Assays unterschieden (29). Zu den katalytischen Assays, mit denen Chinolonkonzentrationen bestimmt werden können, die eine Hemmung der enzymatischen Aktivität von pro- bzw. eukaryontischen Topoisomerasen bewirken, werden Überspiralisierungs- (50, 112, 113, 275, 356, 357), Catenierungs- (151), Decatenierungs- (288) oder Relaxierungshemmtests (75, 172, 273, 390) gezählt. In der Regel sind für eine Hemmung der Enzymaktivität relativ hohe Inhibitor-konzentrationen notwendig. Gemessen wird üblicherweise die Fluorchinolonkonzentration, die eine 50 bzw. 100%ige Inhibierung der jeweiligen Reaktion bewirkt. Die inhibitorische Konzentration wird angegeben als IC_{50} - bzw. IC_{100} -Wert. Beispielsweise betragen die von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelten IC_{50} -Werte von Ciprofloxacin für die Inhibierung der Überspiralisierungsreaktion von *E. coli* Gyrase 0,072 bis 1 $\mu\text{g/ml}$ (146, 361), der von Moreau et al. ermittelte IC_{100} -Wert 10 $\mu\text{g/ml}$ (247). Die Schwankungen bei den IC_{50} -Werten sind auf die Verwendung verschiedener Enzym- und DNA-Mengen sowie auf unterschiedliche Reaktionsbedingungen (Temperatur, Pufferzusammensetzung) in den Studien zurückzuführen, da es bislang keine klar definierten, einheitlichen Testbedingungen gibt.

In nicht-katalytischen Assays, wie Cleavage-Assays, werden Fluorchinolonkonzentrationen ermittelt, die in der Lage sind Topoisomerase-assoziierte Doppelstrangbrüche hervorzurufen (29, 411). Die Reaktion in diesen Tests unterliegt dabei stöchiometrischen Gesetzmäßigkeiten (29). Bezogen auf das neueste Modell zur Fluorchinolonwirkung von Leo et al. bedeutet dies, dass für jeden DNA-Doppelstrangbruch ein Typ II-Topoisomerasemolekül als Komplex mit zwei Fluorchinolonmolekülen reagiert (195). Die Angabe der DNA-Cleavage-Konzentration erfolgt in der Regel als CC_{25} - oder CC_{50} -Wert (Konzentration, bei der 25% bzw. 50% eines DNA-Substrats in gespaltener Form

vorliegt). Für die Generierung von Doppelstrangbrüchen sind daher deutlich geringere Substanzkonzentrationen notwendig als zur Hemmung der Enzymaktivität. Blanche et al. ermittelten z.B. die IC₅₀- und CC₅₀-Werte von Ciprofloxacin für *E. coli* Gyrase (41). Hierbei lag der CC₅₀-Wert mit < 0,05 µg/ml um das ca. 15-fache geringer als der IC₅₀-Wert (0,75 µg/ml). Cleavage-Assays sind somit deutlich sensitiver als katalytische Tests. Da in Cleavage-Assays das zentrale Ereignis der Fluorchinolonwirkung – die Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen – ermittelt wird, stellen diese Tests ein indirektes Maß für die antibakterielle Wirkung von Fluorchinolonen dar und scheinen somit für eine vergleichende Untersuchung der biologischen Aktivität dieser Substanzen relevanter zu sein (84, 389). In der vorliegenden Arbeit wurden daher Cleavage-Assays mit isolierter Gyrase bzw. Topoisomerase IV von *E. coli* durchgeführt, um die relative Aktivität von Pradofloxacin und weiteren Fluorchinolonen auf beide Zielstrukturen zu ermitteln.

4.2.1.1 Eignung des CC₁₀-Wertes für die Bestimmung der Aktivität von Fluorchinolonen auf bakterielle Zielstrukturen

Vor der Durchführung der Cleavage-Assays wurden die geeigneten Test-Bedingungen ermittelt (Daten nicht gezeigt). Hierzu zählte die Bestimmung der optimalen Pufferzusammensetzung, Reaktionszeit und -temperatur. Darüber hinaus wurden verschiedene Enzymmengen gegenüber gleichbleibenden Plasmid-DNA-Mengen austitriert, um ein geeignetes Verhältnis der beiden Komponenten zu erhalten. D.h. es wurde die Enzymmenge ermittelt, die in Abwesenheit von Fluorchinolonen gerade noch in der Lage war, das DNA-Substrat überzusprialisieren (im Fall von Gyrase) bzw. zu relaxieren (im Fall von Topoisomerase IV). Nach der Optimierung der Assay-Bedingungen wurden Standardprotokolle für beide Topoisomerase-Cleavage-Assays erstellt (**2.2.2.12.1** und **2.2.2.12.2**). Die Auswertung der Cleavage-Assays erfolgte anhand von Agarosegelen (**Abbildungen 3.12** und **3.13**) mit Hilfe eines Densitometers. Um die Aktivitäten der einzelnen Substanzen gegenüber den Zielstrukturen vergleichen zu können, wurde in dieser Arbeit erstmals die minimale Konzentration zur Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen – die Cleavage-Konzentration 10 (CC₁₀) – bestimmt. Hierbei handelt es sich um die Fluorchinolonkonzentration, die eine Zunahme des linearen Cleav-

age-Produkts um 10% (bei einem Fehlerbereich von $\pm 3\%$) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (keine Fluorchinolonzugabe) zur Folge hat. Werden die im Gyrase- bzw. Topoisomerase IV-Cleavage-Assay ermittelten CC_{10} -Werte der getesteten Fluorchinolone z.B. mit den CC_{25} -Werten (Zunahme des linearen Cleavage-Produkts um $25\% \pm 3\%$) verglichen, so ergeben sich mit den CC_{10} -Werten ähnliche Aktivitätsunterschiede zwischen den Fluorchinolonen wie bei Verwendung der CC_{25} -Werte. Beispielsweise betragen die im Gyrase-Cleavage-Assay ermittelten CC_{10} -Werte für BayY3118, Prado- und Enrofloxacin je $0,005 \mu\text{g/ml}$ (**7.1, Tabellen 7.1, 7.2 und 7.10**). Diese Fluorchinolone wiesen somit eine höhere Aktivität auf Gyrase auf als Moxi- und Gemifloxacin (CC_{10} -Wert je $0,01 \mu\text{g/ml}$) (**7.1, Tabellen 7.7 und 7.8**). Bei Betrachtung der CC_{25} -Werte zeigten sich BayY3118, Prado- und Enrofloxacin (CC_{25} -Wert je $0,05 \mu\text{g/ml}$) ebenfalls aktiver als Moxi- und Gemifloxacin (CC_{25} -Werte $> 0,05 \mu\text{g/ml}$) (**7.1, Tabellen 7.1, 7.2, 7.7, 7.8 und 7.10**). Dies bedeutet, dass der CC_{10} -Wert für die Bestimmung der Aktivität von Fluorchinolonen auf bakterielle Typ II-Topoisomerasen geeignet ist. Da theoretisch nur ein einzelner ternärer Komplex ausreicht, um einen Doppelstrangbruch hervorzurufen und die Zelle irreversibel zu schädigen („single hit event“) (176), stellt der CC_{10} -Wert (minimale Konzentration zur Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen) jedoch ein genaueres Maß für die Aktivität der Fluorchinolone als der CC_{25} -Wert dar.

Die hier durchgeführten Cleavage-Assays sind sehr sensitiv. Im Gyrase-Cleavage-Assay betragen die geringsten CC_{10} -Werte $0,005 \mu\text{g/ml}$, im Topoisomerase IV-Cleavage-Assay $0,01 \mu\text{g/ml}$. Die Sensitivität der Tests kann am Beispiel des Gyrase-Cleavage-Assays verdeutlicht werden, sofern der für Ciprofloxacin erhaltene CC_{10} -Wert mit Werten aus der Literatur für einen ersten detektierbaren Cleavage verglichen wird. In Untersuchungen von Barrett et al. konnte ein erster Cleavage bei einer Konzentration von $0,2 \mu\text{g/ml}$ detektiert werden (28). Mit Hilfe des in dieser Arbeit vorgestellten Gyrase-Cleavage-Assays gelang die Detektion des CC_{10} -Wertes von Ciprofloxacin bei $0,005 \mu\text{g/ml}$ (**3.2.1, Tabelle 3.2.1**). Diese Konzentration lag somit um das 20-fache niedriger als die von Barrett et al. ermittelte Konzentration. Obwohl einige Testbedingungen ($30 \mu\text{l}$ Reaktionsansatz, 25 min Inkubation bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$) in beiden Untersuchungen identisch waren, unterscheidet sich die Methode von Barrett et al. von der hier beschriebenen in drei Parametern. Anstatt 2 U Gyrase, $0,3 \mu\text{g}$ pBR322-DNA und $0,2 \text{ mM}$ ATP wurden in der vorliegenden Arbeit 6 U Gyrase, $0,15 \mu\text{g}$ pBR322-DNA und 5 mM ATP

eingesetzt. Auf Grund der hohen Sensitivität des hier beschriebenen Gyrase-Cleavage-Assays liegen die drei Komponenten (Gyrase, DNA und ATP) offensichtlich in einem geeigneten Verhältnis zueinander vor. ATP beispielsweise ist notwendig für die Änderungen der Konformation von Gyrase (und Topoisomerase IV) bzw. deren Reaktionsfähigkeit (**1.3, Abbildung 1.6**). Typ II-Topoisomerasen sind ohne Bindung von ATP nicht in der Lage, Doppelstrangbrüche in die DNA einzuführen. Daraus folgt, dass bei wenig ATP nur wenige reaktionsfähige Typ II-Topoisomerase-DNA-Komplexe entstehen, die durch Fluorchinolone gehemmt werden können. Eine höhere ATP-Konzentration, wie im vorliegenden Assay (0,8 mM ATP / 1 U Gyrase im Vergleich zu 0,1 mM ATP / 1 U Gyrase bei Barrett et al.), ist somit zur Erhaltung der Reaktionsfähigkeit des Enzyms und dementsprechend für die Bildung ternärer Komplexe wichtig.

4.2.1.2 Aktivität von Pradofloxacin auf Gyrase und Topoisomerase IV

Die Daten aus **Tabelle 3.10 (3.2.1)** weisen darauf hin, dass BayY3118, Prado-, Enro-, Marbo-, Dano-, Orbi- und Ciprofloxacin bereits bei geringen Konzentrationen (CC_{10} -Werte jeweils 0,005 $\mu\text{g/ml}$) mit *E. coli* Gyrase interagieren und demzufolge DNA-Doppelstrangbrüche hervorrufen. Im Gegensatz dazu benötigen die Fluorchinolone Garenoxacin, Moxi- und Gemifloxacin doppelt so hohe Konzentrationen zur Stabilisierung von Gyrase-DNA-Komplexen bzw. zur Generierung von Doppelstrangbrüchen (CC_{10} -Werte jeweils 0,01 $\mu\text{g/ml}$). Unterschiede in den Aktivitäten der Substanzen konnten auch in den Cleavage-Assays mit Topoisomerase IV beobachtet werden. Hierbei zeigten sich Garenoxacin und Gemifloxacin besonders aktiv. Mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$ besaßen diese Substanzen die geringsten CC_{10} -Werte. Im Vergleich dazu lagen die CC_{10} -Werte von BayY3118, Prado-, Enro-, Marbo-, Orbi- und Moxifloxacin mit jeweils 0,05 $\mu\text{g/ml}$ um das 2-fache, die CC_{10} -Werte von Dano- und Ciprofloxacin mit jeweils 0,1 $\mu\text{g/ml}$ sogar um das 10-fache höher. Da die getesteten Fluorchinolone sich in der Regel durch mehr als einen Substituenten unterscheiden (**1.2, Abbildung 1.4**), ist eine Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen den einzelnen Substanzen nur in Ausnahmefällen, wie z.B. für BayY3118, Prado- und Moxifloxacin, möglich. Diese Substanzen unterscheiden sich nur durch den jeweiligen C8-Substituenten (-Cl, -CN bzw. -OCH₃) voneinander. Alle drei Fluorchinolone besaßen eine gleich gute Aktivität auf Topoisomerase IV von

E. coli (CC₁₀-Werte jeweils 0,05 µg/ml). Für eine Interaktion mit *E. coli* Gyrase hingegen schien die Chlor- bzw. Cyanogruppe an C8 von BayY3118 bzw. Pradofloxacin besser geeignet zu sein als die C8-Methoxygruppe von Moxifloxacin.

Der Vergleich der CC₁₀-Werte aller Fluorchinolone für Gyrase mit den entsprechenden Werten für Topoisomerase IV lässt den Schluss zu, dass einige Fluorchinolone in gleichem Maße mit Gyrase und Topoisomerase IV, andere hingegen bevorzugt mit Gyrase interagieren (**3.2.1, Tabelle 3.10**). So benötigten Cipro- und Danofloxacin eine 20-mal höhere Konzentration für die Stabilisierung von Topoisomerase IV-DNA-Komplexen (CC₁₀ = 0,1 µg/ml) als von Gyrase-DNA-Komplexen (CC₁₀ = 0,005 µg/ml). Die Bestimmung der CC₅₀-Werte von Ciprofloxacin mit isolierter *E. coli* Gyrase und Topoisomerase IV durch Blanche et al. ergaben Konzentrationen von < 0,05 µg/ml für Gyrase und 0,1 µg/ml für Topoisomerase IV (41). Somit konnten Blanche et al. ebenfalls eine unterschiedlich starke Stabilisierung von Gyrase- bzw. Topoisomerase IV-DNA-Komplexen nachweisen. Gyrase stellt somit für Ciprofloxacin und – wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte – auch für Danofloxacin die bevorzugte Zielstruktur dar. Dies trifft ebenso auf die Fluorchinolone BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin und die veterinärmedizinisch verwendeten Fluorchinolone Enro-, Marbo- und Orbifloxacin zu. Jedoch zeigten diese Fluorchinolone im Vergleich zu Ciprofloxacin eine höhere Aktivität gegenüber Topoisomerase IV. BayY3118, Prado-, Enro-, Marbo- und Orbifloxacin benötigten jeweils nur eine 10-mal, Moxifloxacin sogar nur eine 5-mal höhere Konzentration für eine Interaktion mit Topoisomerase IV im Vergleich zu Gyrase. Gemifloxacin und Garenoxacin besaßen gleich hohe CC₁₀-Werte für beide Enzyme (je 0,01 µg/ml), was für ein dual-targeting spricht. Bezogen auf die Aktivität der Fluorchinolone gegenüber beiden Zielstrukturen ergibt sich somit folgende Reihenfolge:

Garenoxacin = Gemifloxacin > Moxifloxacin > BayY3118, Prado-, Enro-, Marbo-, Orbifloxacin > Cipro-, Danofloxacin

Bei ausschließlicher Betrachtung der obigen Einteilung der Fluorchinolone nach ihrer Aktivität auf Gyrase und Topoisomerase IV könnte geschlossen werden, dass Garenoxacin, Gemi- und Moxifloxacin eine höhere, Enro- und Marbofloxacin eine gleich hohe antibakterielle Wirkung im Vergleich zu Pradofloxacin besitzen. Es muss jedoch zusätzlich bedacht werden, dass in Cleavage-Assays nur der Effekt auf isolierte Zielstrukturen

beurteilt wird. D.h. zusätzliche Zellkomponenten, wie die Zellmembran, Effluxpumpen oder Porine, die einen Einfluss auf die Chinolonwirkung haben können, fehlen in dieser Versuchsanordnung. Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten In-vivo-Testsystems (3.2.2 / 4.2.2) konnte beispielweise gezeigt werden, dass Pradofloxacin in *E. coli* WT zur Induktion der SOS-Antwort (leitet bakteriellen Zelltod ein) eine deutlich geringere Konzentration (480 pg/ml) als Enro- (1.900 pg/ml), Marbo- (1.900 pg/ml) und Moxifloxacin (3.900 pg/ml) benötigte. Dies lässt darauf schließen, dass die antibakterielle Wirkung eines Fluorchinolons nicht nur von der hohen Aktivität der Substanz auf beide Zielstrukturen, sondern auch von anderen Faktoren (z.B. eine erhöhte Akkumulation der Substanz in der Zelle) abhängig ist.

Ungeachtet der Tatsache, dass In-vivo-Tests für die Beurteilung der antibakteriellen Wirkung von Fluorchinolonen erforderlich sind, stellen die hier durchgeführten Cleavage-Assays mit *E. coli* Gyrase und Topoisomerase IV eine einzigartige Möglichkeit für die Ermittlung der Aktivität der Substanzen auf die Zielstrukturen in vitro dar. Da in Cleavage-Assays das gleiche molekulare Ereignis – die Stabilisierung von DNA-Doppelstrangbrüchen – bestimmt wird, ist darüber hinaus im Gegensatz zu katalytischen Assays (verschiedene Enzymaktivitäten werden bestimmt) ein direkter Vergleich der Aktivität von Fluorchinolonen auf Gyrase mit der auf Topoisomerase IV möglich. Weiterhin können Cleavage-Assays Aufschluss über die Aktivität von Fluorchinolonen auf veränderte (mutierte) Zielstrukturen geben. So zeigten Yague et al., dass die Aktivität von Gemifloxacin auf eine veränderte Topoisomerase IV (Ser79Phe) von *S. pneumoniae* im Vergleich zum Wildtyp-Enzym um das ca. 100-fache geringer war (411).

4.2.2 Induktion der SOS-Antwort durch Pradofloxacin

Mit Hilfe der Cleavage-Assays (4.2.1) wurde die Aktivität von Fluorchinolonen auf isolierte Zielstrukturen bzw. ihre Fähigkeit zur Stabilisierung von bakteriellen Typ II-Topoisomerase-DNA-Komplexen in vitro untersucht. Die daraus resultierende Schädigung der DNA in Form von Doppelstrangbrüchen stellt das zentrale Ereignis der Chinolonwirkung dar. Die DNA-Läsionen führen jedoch nicht unmittelbar zum Zelltod. Letzterer wird durch die Induktion des bakteriellen SOS-Systems (1.4) eingeleitet (122, 236, 292, 293). Als Auslöser für die Induktion der SOS-Antwort werden einzelsträngige

DNA-Bereiche vermutet. Somit müssen Doppelstrangbrüche zu Einzelstrangregionen degradiert werden. Diese Aufgabe wird durch den Enzymkomplex RecBCD übernommen (13, 57, 364). Die Einzelstrangregionen werden anschließend durch das RecA-Protein erkannt, welches eine zentrale Rolle in der Induktion der SOS-Antwort spielt. Die Bindung von RecA an einzelsträngige DNA führt zur Aktivierung der Coproteaseaktivität von RecA (Nucleoproteinfilament), das in dieser Form die Selbstspaltung (Autocleavage) des Repressors der SOS-Gene LexA stimuliert (86, 208, 345). Durch die Freisetzung des LexA-Proteins von den Promotorbereichen der SOS-Gene (hierzu wird auch *recA* gezählt) wird die Expression von über 30 Genen induziert, die für Enzyme codieren, welche in die DNA-Rekombination, -Reparatur und -Mutagenese involviert sind (62, 139, 162, 385). Fluorchinolone führen zu einer permanenten Induktion der SOS-Antwort, da die verursachten DNA-Schäden nur unvollständig (durch Fehler behaftete Reparaturmechanismen) behoben werden können. Während der DNA-Reparatur verhindert das SOS-Enzym SfiA (SulA) die Zellteilung. Dazu bindet SfiA an das FtsZ-Protein und verhindert somit die Septuminitiation (Einschnürung der Zellwand) – den ersten Schritt der Zellteilung (138, 150, 165). Eine anhaltende Induktion der SOS-Antwort führt zu einer dauerhaften Hemmung der Zellteilung und zur Filamentierung (Längenwachstum). Das Längenwachstum der Zelle ist jedoch begrenzt (z.B. durch die zur Neige gehenden Zellwandbausteine). Es wird davon ausgegangen, dass an diesem Wachstumsendpunkt durch einen unbekanntem Mechanismus Autolysine aktiviert werden, die letztendlich den Zelltod hervorrufen (203).

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines neuentwickelten In-vivo-Testsystems die minimale, zur Induktion der SOS-Antwort notwendige Konzentration (MSIC) von Pradofloxacin und weiteren Fluorchinolonen bestimmt. Die Induktion der SOS-Antwort beruht dabei auf der Generierung von Doppelstrangbrüchen. Im In-vivo-Testsystem wurde somit indirekt das gleiche molekulare Ereignis wie in den Cleavage-Assays mit isolierter Gyrase und Topoisomerase IV bestimmt. Im Gegensatz zu den Cleavage-Assays wurden im In-vivo-Testsystem jedoch zusätzliche Zellkomponenten (Zellmembran, Effluxpumpen oder Porine), die einen Einfluss auf die Chinolonwirkung haben können, berücksichtigt.

4.2.2.1 Entwicklung des In-vivo-Testsystems (*recA-luc*-Reportergenassay)

Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte In-vivo-Testsystem beruht auf der Reporter-gentechnologie. Dabei wurde das leicht zu detektierende Reporter-gen *luc*, das für die Luciferase aus *Photinus pyralis* (nordamerikanischer Feuerschwanz) codiert, mit Hilfe der SOEing-Technik (2.2.2.4.2) mit dem *recA*-Promotor verbunden. Das entstandene *recA-luc*-Fragment wurde in den Vektor pBR322 kloniert und das Konstrukt in Zellen verschiedener *E. coli* Stämme (Wildtyp und Topoisomerasemutanten) transformiert (3.2.2.1). Die im Testsystem verwendete „Glühwürmchen“-Luciferase stellt eines der empfindlichsten Reporter-gene dar, da eine Quantifizierung von minimalen Enzymkonzentrationen (bis zu 10^{-20} mol) möglich ist (44, 89). Die Messung – im vorliegenden Fall der SOS-Induktion – ist somit sehr sensitiv. Da das *luc*-Gen im Gegensatz zu anderen Reporter-genen, wie z.B. der Gene für die TEM-I β -Lactamase oder β -Galactosidase, natürlicherweise nicht in Bakterien vorkommt, ist eine Detektion ohne störende Hintergrundaktivität möglich. Im Vergleich zu anderen eukaryontischen Genen liegt das *luc*-Gen als intronfreie cDNA vor, so dass eine Transkription in eine funktionstüchtige mRNA auch in Prokaryonten stattfinden kann. Darüber hinaus ist keine posttranslationale Modifikation des Enzyms notwendig (78). Neben der hohen Sensitivität besitzt die „Glühwürmchen“-Luciferase einen zusätzlichen Vorteil gegenüber anderen Reporter-genen. Im Gegensatz zur bakteriellen Luciferase von *Vibrio fischeri*, die von den Genen *luxA* und *luxB* des *lux*-Operons (*luxABCDE*) codiert wird, führt die Expression des *luc*-Gens zu keiner autonomen Biolumineszenz (410). Für die Messung eines Biolumineszenzsignals ist somit die Zugabe eines Substrats (Luciferin) notwendig. Im vorliegenden Testsystem war es dadurch möglich, den Zeitpunkt der Luciferaseaktivitätsbestimmung selbst zu wählen.

Der *recA*-Promotor wurde für das In-vivo-Testsystem ausgewählt, da dieser bei einer DNA-Schädigung häufiger als andere SOS-Gen-Promotoren angesprochen wird. Darauf weist die stark erhöhte Anzahl von RecA-Proteinen in Folge einer DNA-Schädigung (Induktionssignal für RecA) hin. In induzierten Zellen steigt die Anzahl der RecA-Proteine von ca. 7.200 (Grundwert der *recA*-Expression in nicht induzierten Zellen) auf ca. 180.000 an (328, 386). Übertragen auf das *recA-luc*-Reportergensystem bedeutet dies, dass nach einer DNA-Schädigung die Luciferasekonzentration und somit auch das Biolumineszenzsignal deutlich ansteigt. Bei Verwendung anderer SOS-Gen-

Promotoren, wie z.B. des *uvrA*- oder *uvrD*-Promotors, wird eine solch hohe Signalstärke nicht erreicht. In induzierten Zellen steigt die Anzahl der UvrA-Proteine nur von ca. 25 auf ca. 250 bzw. der UvrD-Proteine von ca. 2.400 auf ca. 5.100 (20, 386). Entsprechend gering wäre die Luciferasekonzentration im Testsystem. Ein weiteres Auswahlkriterium für den *recA*-Promotor war die schnelle Induktion von RecA. Ein erstes Biolumineszenzsignal ist bereits nach 60 min messbar. Bei Verwendung des *uvrA*-Promotors ist dies erst nach 100 min möglich (383). Darüber hinaus kann anhand einer Veränderung des Grundwertes der *recA*-Expression erkannt werden, ob andere, nicht durch den Induktor hervorgerufene, toxische Effekte (z.B. durch Reste von zellschädigenden Substanzen an den für die Testung verwendeten Materialien) vorliegen. Dafür würde eine Abnahme des Grundwertes sprechen (383). Im Gegensatz dazu weist eine Erhöhung dieses Wertes auf eine *recA*-Induktion durch einen Anstieg des pH-Wertes des Kulturmediums (pH > 8) (86), DNA-schädigende Umwelteinflüsse, wie z.B. UV-Strahlung (185), oder eine Messung außerhalb des optimalen Temperaturbereiches von 20 bis 25 °C für Luciferase (Daten nicht gezeigt) hin. Der Grundwert der *recA*-Expression stellt somit eine interne Kontrolle für das In-vivo-Testsystem dar.

4.2.2.2 Optimierung des In-vivo-Testsystems

Bevor das *precA-luc*-Reportersystem für die Ermittlung der minimalen SOS-induzierenden Konzentration von Fluorchinolonen eingesetzt werden konnte, wurden zunächst die Testbedingungen in mehreren Vorversuchen optimiert.

Durch Variation der Konzentrationen der verschiedenen Reaktionspartner – Bakterienlysat und Luciferin-Assay-Reagent (LAR) – konnte gezeigt werden, dass die Kombination von 2,5 µl Bakterienlysat mit 25 µl LAR optimal für die Messung der Biolumineszenz [RLU] war (3.2.2.2.2). Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass auch bei einer höheren Luciferaseaktivität genügend Luciferin für die Umsetzung in Oxyluciferin zur Verfügung stand.

Für die Ermittlung der spezifischen Luciferaseaktivität wurden die RLU-Werte einer Probe zur optischen Dichte in Relation gesetzt. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme (70 min nach Induktion mit einem Fluorchinolon) nahm der OD_{546nm}-Wert einer Probe einen Wert zwischen 0,4 und 0,6 an und lag somit in dem OD-Bereich (0,3 bis 0,8), in

welchem eine gute lineare Korrelation zwischen OD_{546nm} - und RLU-Werten bestand (3.2.2.2.3). Durch den Bezug der RLU- auf die OD_{546nm} -Werte wurde eine hohe Reproduzierbarkeit der spezifischen Luciferaseaktivität erreicht. Die prozentuale Streuung um den Mittelwert der spezifischen Luciferaseaktivität gleicher Proben (gleiche Induktionskonzentration) betrug $\leq 10\%$.

Der Zusatz von Glucose zum Testmedium hatte eine geringere *recA*-Induktion bzw. eine Verringerung der spezifischen Luciferaseaktivität zur Folge. Nach Studien von Taddei et al. wird in Zellen, denen das Protein Adenylat-Cyclase fehlt, die SOS-Antwort unterbunden (360). Adenylat-Cyclase katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. cAMP aktiviert das CAP-Protein (Katabolitgen-Aktivatorprotein), welches u.a. für die Transkription des *lac*-Operons notwendig ist (307). Glucose hemmt indirekt die Adenylat-Cyclase. In Abwesenheit von Glucose aktiviert ein membrangebundenes Phosphoprotein, das Teil des Glucose-Transport-Systems ist, die Adenylat-Cyclase. In Anwesenheit von Glucose hingegen überträgt das Phosphoprotein seine Phosphatgruppe auf Glucose und kann in diesem Zustand die Adenylat-Cyclase nicht aktivieren. Somit wird die Bildung von cAMP bzw. die Transkription des *lac*-Operons unterbunden. Offensichtlich spielt cAMP ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Initiation der Transkription der SOS-Gene. Zur Aufrechterhaltung der Sensitivität des Testsystems und der Signalintensität wurde daher in allen weiteren Bestimmungen der SOS-Induktion Glucosefreie LB-Bouillon eingesetzt.

In allen SOS-Induktions-Versuchen wurden drei uninduzierte Kontrollansätze (ohne Fluorchinolonzugabe) mitgeführt. Der Mittelwert der spezifischen Luciferaseaktivitäten dieser Kontrollansätze ergab den Grundwert der *recA*-Induktion. Durch die Korrektur der spezifischen Luciferaseaktivitätswerte der mit Fluorchinolonen induzierten Ansätze um den Grundwert der *recA*-Induktion (Berechnung s. 2.2.2.11) war es möglich, ausschließlich die durch die Substanzen hervorgerufene *recA*-Induktion zu bestimmen.

Die spezifische Luciferaseaktivität der uninduzierten Kontrollen wies eine Schwankungsbreite von 100 RLU/ OD_{546nm} auf. Dieser Wert diente als Schwellenwert zur Bestimmung der minimalen SOS-induzierenden Konzentration (MSIC). D.h. die geringste Konzentration eines Fluorchinolons, die einen Anstieg der spezifische Luciferaseaktivität (nach Korrektur um den Grundwert) um mehr als 100 RLU/ OD_{546nm} zur Folge hatte, wurde als MSIC bezeichnet.

4.2.2.3 Bestimmung der MSIC von Pradofloxacin

Die getesteten Fluorchinolone Prado-, Cipro-, Enro-, Marbo- und Moxifloxacin induzierten die SOS-Antwort in *E. coli* WT und den Topoisomerasemutanten WT-4 (Mutation in *parC*), WT-K (Mutation in *gyrB*) und WT-3-1 (Doppelmutation in *gyrA*) bereits bei Konzentrationen weit unterhalb der entsprechenden MHK (3.2.3, **Abbildungen 3.26 bis 3.29**). Die MSIC von Pradofloxacin betrug für WT und WT-4 je 480 pg/ml, für WT-K 1.900 pg/μl und für WT3-1 15.600 pg/ml. Anhand des Verhältnisses der MSIC-Werte zu den MHK-Werten von Pradofloxacin (**Tabelle 3.21**) für die einzelnen Stämme konnte gezeigt werden, dass die MSIC-Werte um das 16- bis 32-fache niedriger lagen als die MHK-Werte. Im Vergleich dazu lagen die MSIC-Werte von Cipro- und Moxifloxacin jeweils um das 16-fache, von Enro- und Marbofloxacin jeweils um das 8- bis 16-fach niedriger als die entsprechenden MHK-Werte für die einzelnen Stämme (**Tabellen 3.21 bis 3.24**). Da das Verhältnis der MSIC- zu den MHK-Werten jedoch keinen direkten Aufschluss über die Aktivität der Substanzen gegenüber den *E. coli* Stämmen lieferte, wurden die MSIC-Werte der Fluorchinolone für die einzelnen Stämme miteinander verglichen. Daraus ergab sich folgende Reihenfolge:

E. coli WT: Prado- (480 pg/ml) > Cipro- (950 pg/ml) > Enro- (1.900 pg/ml) = Marbo- (1.900 pg/ml) > Moxifloxacin (3.900 pg/ml)

E. coli WT-4: Prado- (480 pg/ml) = Cipro- (480 pg/ml) > Enro- (950 pg/ml) = Marbo- (950 pg/ml) > Moxifloxacin (3.900 pg/ml)

E. coli WT-K: Prado- (1.900 pg/ml) > Cipro- (7.800 pg/ml) = Enro- (7.800 pg/ml) = Marbo- (7.800 pg/ml) = Moxifloxacin (je 7.800 pg/ml)

E. coli WT-3-1: Prado- (15.600 pg/ml) = Cipro- (15.600 pg/ml) > Enro- (31.250 pg/ml) = Moxi- (31.250 pg/ml) > Marbofloxacin (62.500 pg/ml)

Hieraus geht hervor, dass Pradofloxacin die geringsten MSIC-Werte für alle *E. coli* Stämme besitzt. Die frühe Induktion der SOS-Antwort durch Pradofloxacin in *E. coli* WT ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass – im Gegensatz zu den anderen Fluor-

chinolonen – bereits bei geringen Konzentrationen genügend Wirkstoff in die Zelle eindringen kann (z.B. durch eine erleichterte Diffusion durch Porine bzw. erleichterte Penetration der Zellmembran), um Topoisomerase-assoziierte DNA-Doppelstrangbrüche hervorzurufen. Im Vergleich zu Moxi- und Ciprofloxacin könnte die höhere Aktivität von Pradofloxacin auf Gyrase bzw. Topoisomerase IV, die mit Hilfe der Cleavage-Assays ermittelt werden konnte (**3.2.1, Tabelle 3.10**), die Ursache für die frühe Induktion der SOS-Antwort sein. Im Vergleich zu Enro- und Marbofloxacin trifft dies nicht zu. Diese Fluorchinolone besaßen in den Cleavage-Assays mit Gyrase und Topoisomerase IV jeweils die gleichen CC_{10} -Werte wie Pradofloxacin und verfügten somit *in vitro* über eine gleich hohe Aktivität auf beide Topoisomerasen (**3.2.1, Tabelle 3.10**). Die frühe Induktion der SOS-Antwort durch Pradofloxacin ist hierbei wohl eher auf einen erleichterten Eintritt dieser Substanz in die Zelle zurückzuführen. Dafür sprechen auch die im Vergleich zu Enro- und Marbofloxacin 2- bis 16-fach niedrigeren MHK-Werte von Pradofloxacin gegenüber genetisch definierten *E. coli* Stämmen (**3.1.1, Tabelle 3.1**). Da in den Topoisomerasemutanten WT-4, WT-K und WT-3-1 ebenfalls geringere Konzentrationen von Pradofloxacin zur Induktion der SOS-Antwort benötigt wurden, ist anzunehmen, dass auch hier die erhöhte Akkumulation der Substanz in der Zelle und/oder eine erhöhte Aktivität von Pradofloxacin auf Gyrase oder Topoisomerase IV von Bedeutung ist.

Die bisherige Auswertung der Ergebnisse bezog sich auf den Vergleich der MSIC-Werte der Fluorchinolone untereinander. Bei der Betrachtung der MSIC-Werte der Fluorchinolone für die einzelnen Topoisomerasemutanten konnten je nach Mutation mehr oder weniger starke Unterschiede zum jeweiligen MSIC-Wert des Wildtyps nachgewiesen werden. Für die *gyrA*-Doppelmutante, deren SOS-Antwort vorrangig über eine Hemmung von Topoisomerase IV erfolgen muß, zeigte Pradofloxacin einen im Vergleich zum Wildtyp 32-fach erhöhten MSIC-Wert. Die Werte der übrigen Fluorchinolone erhöhten sich ebenfalls um das 8- bis 32-fache. Für die *gyrB*-Mutante WT-K konnte für alle getesteten Fluorchinolone ein geringerer Anstieg der MSIC (2- bis 8-fach) beobachtet werden. Gegenüber Mutante WT-4, deren Topoisomerase IV durch eine *parC*-Mutation unempfindlicher geworden ist, bestand kein Unterschied zum Wildtyp-Stamm. Die erhöhten MSIC-Werte für die *gyrB*-Mutante bestätigen die Daten anderer Studien, wonach neben der GyrA- auch die GyrB-Untereinheit von Gyrase an der Interaktion

zwischen Fluorchinolon und Enzym beteiligt ist (127). Aus den erhöhten Werten für beide Gyrase-Mutanten kann geschlossen werden, dass alle hier untersuchten Fluorchinolone bevorzugt mit Gyrase und in einem geringen Maße mit Topoisomerase IV interagieren. Dies bestätigen die Ergebnisse der Cleavage-Assays mit *E. coli* Gyrase (4.2.1.2) und der Selektionsversuche mit *E. coli* WT (4.1.2.1). Neben der hohen Affinität der Fluorchinolone zu Gyrase in *E. coli* wird die Selektivität für diese Zielstruktur vermutlich auch durch die relative Menge und Verteilung von Gyrase und Topoisomerase IV während der Replikation beeinflusst (176). Gyrase ist vor der Replikationsgabel und während der gesamten Elongationsphase der Replikation aktiv, wohingegen Topoisomerase IV hinter der Replikationsgabel und erst am Ende der Replikation aktiv wird (176, 418). Khodursky et al. schlossen daraus, dass eine Replikationsgabel mit höherer Wahrscheinlichkeit mit einem Fluorchinolon-Gyrase-DNA-Komplex als mit einem Fluorchinolon-Topoisomerase IV-DNA-Komplex kollidiert (176). Auf Grund der Lokalisation von Topoisomerase IV hinter der Replikationsgabel ist darüber hinaus denkbar, dass ternäre Komplexe mit diesem Enzym dissoziieren oder DNA-Schäden repariert werden, bevor die Replikationsgabel diese erreicht (176). Studien von Shea et al. ergaben beispielsweise, dass DNA-Schäden, die durch ternäre Komplexe mit Topoisomerase IV hervorgerufen werden, durch andere effizientere Reparaturmechanismen (postreplikative Reparatur) behoben werden, als solche, die durch ternäre Komplexe mit Gyrase entstehen (339).

4.2.2.4 Beeinflussung der SOS-Induktion durch verschiedene Faktoren

Neben der MSIC konnte mit dem vorliegenden In-vivo-Testsystem der Einfluss von drei Faktoren (verwendete Substanz, eingesetzte Konzentration, Inkubationszeit) auf das Ausmaß der SOS-Induktion bestimmt werden.

Einfluss der verwendeten Substanz auf das Ausmaß der SOS-Induktion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der *recA*-Induktion von der jeweils induzierenden Substanz abhängig ist. So wurde die stärkste Induktion in allen getesteten *E. coli* Stämmen mit Pradofloxacin unter Verwendung der 0,5-fachen MHK gemessen (Abbildungen 3.26 bis 3.29). In *E. coli* WT betrug die spezifische Lu-

ciferaseaktivität nach Behandlung der Zellen mit Pradofloxacin (0,5-fache MHK) beispielsweise 1.992 RLU/OD_{546nm}. Im Gegensatz dazu lagen die spezifischen Luciferaseaktivitäten von Cipro-, Enro-, Marbo- und Moxifloxacin bei Einsatz der entsprechenden 0,5-fachen MHK im Bereich von 1.148 bis 1.322 RLU/OD_{546nm}. Auch bei Verwendung geringerer Konzentrationen überstiegen die Induktionswerte von Pradofloxacin die Werte der anderen Fluorchinolone. Wurden die Fluorchinolone z.B. in 0,125-facher MHK gegen *E. coli* WT eingesetzt, so lag die spezifische Luciferaseaktivität für Pradofloxacin 1,7- bis 1,8-mal höher als für die anderen Fluorchinolone. Die deutlich höheren Induktionswerte von Pradofloxacin im Vergleich zu Cipro-, Enro-, Marbo- und Moxifloxacin bei vergleichbaren Fluorchinolonekonzentrationen beruhen vermutlich – wie bereits im Zusammenhang mit der MSIC erklärt – zum einen auf der hohen Aktivität gegenüber den Zielstrukturen, zum anderen auf einer erhöhten Akkumulation in der Bakterienzelle (**4.2.2.3**).

Einfluss der eingesetzten Konzentration auf das Ausmaß der SOS-Induktion

Aus den **Abbildungen 3.26 bis 3.29** kann entnommen werden, dass die *recA*-Induktion proportional zur eingesetzten Fluorchinolonekonzentration in allen *E. coli* Stämmen zunahm. So stieg die spezifische Luciferaseaktivität, d.h. die *recA*-Induktion, in *E. coli* WT mit steigenden Konzentrationen von Pradofloxacin von 244 (bei 0,00048 µg/ml) auf 1.952 RLU/OD_{546nm} (bei 0,0078 µg/ml). Ein Vergleich der Induktionskurven für die einzelnen Fluorchinolone (**Abbildungen 3.26 bis 3.29**) zeigte, dass Pradofloxacin für *E. coli* WT, WT-K und WT-3-1 bzw. Prado- und Ciprofloxacin für *E. coli* WT-4 die SOS-Antwort stärker induzierte als die anderen Fluorchinolone. Somit ist anzunehmen, dass mit Pradofloxacin mehr ternäre Komplexe in einzelnen Zellen gebildet bzw. ein höherer Anteil an Zellen der gesamten Population mit steigenden Fluorchinolonekonzentrationen geschädigt wurden.

Parallel zur *recA*-Induktion nahm auch der Anteil filamentierter Zellen sowie das Längenwachstum einzelner Zellen mit steigenden Konzentrationen von Pradofloxacin zu (**Abbildung 3.30**). Der auslösende Mechanismus für die Filamentierung ist wahrscheinlich die Induktion des Zellteilungsinhibitors SfiA. Die Zunahme des Längenwachstum einzelner Zellen lässt eine bereits länger andauernde Induktion dieses Proteins vermuten.

Die Abhängigkeit der SOS-Induktion von der Fluorchinolonekonzentration konnten auch Piddock et al. für Norfloxacin in einem *recA-lacZ*-Assay zeigen (293). In diesen Untersuchungen stieg die Aktivität der β -Galactosidase nach 70 min Inkubation mit Norfloxacin in Konzentrationen von 0,01 bis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ von 120 U/ml auf 390 U/ml an. Darüber hinaus zeigten Vollmer et al. mit Hilfe eines *uvrA-lux*-Assays, dass auch für andere DNA schädigende Substanzen (z.B. Mitomycin) oder Einflüsse (z.B. UV-Licht) eine Konzentrations- bzw. Dosisabhängigkeit der SOS-Induktion besteht (383). Beispielsweise stiegen die Biolumineszenzwerte nach 320 min Bestrahlung von *E. coli* mit einer UV-Licht-Dosis von 120-200 J/m^2 von 0,015 auf 0,06 RLU.

Einfluss der Inkubationszeit auf das Ausmaß der SOS-Induktion

In weiteren Versuchen zur SOS-Induktion wurden Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase mit Pradoxin- oder Ciprofloxacin (eingesetzte Konzentration entsprach der jeweiligen MHK der Fluorchinolone) behandelt. Die mikroskopische Bestimmung des Filamentierungsgrades 70 min bzw. 3 h nach Behandlung der Zellen mit diesen Fluorchinolonen ergab, dass das Längenwachstum mit fortschreitender Inkubationszeit zunahm (**3.2.4, Abbildung 3.31**). Dies spricht für eine andauernde Expression des Zellteilungsinhibitors SfiA und somit für eine anhaltende Induktion der SOS-Antwort durch Pradoxin- und Ciprofloxacin. Im Durchschnitt nahm das Längenwachstum der mit Ciprofloxacin behandelten Zellen um das 3-fache nach 70 min bzw. 5-fache nach 3 h zu. Eine ausgeprägtere Filamentierung konnte mit Pradoxin beobachtet werden. Das Längenwachstum nahm durchschnittlich um das 4-fache nach 70 min bzw. 8-fache nach 3 h zu. Da der Filamentierungsgrad der mit Pradoxin behandelten Zellen den der mit Ciprofloxacin behandelten Zellen bereits nach 70 min überstieg, wurden vermutlich schon zu diesem Zeitpunkt mehr ternäre Komplexe mit Pradoxin als mit Ciprofloxacin gebildet. Als Gründe hierfür können die hohe Aktivität von Pradoxin zu den Zielstrukturen sowie eine erhöhte Akkumulation der Substanz angenommen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach 70 min Inkubation mit Pradoxin 86%, nach 3 h 97% der Zellen in filamentierter Form vorlagen. Im Vergleich dazu wiesen nach Behandlung mit Ciprofloxacin nur 68% der Zellen nach 70 min und 88% nach 3 h ein Längenwachstum auf. Demnach werden bei längerer Inkubationszeit mehr Zellen durch Pradoxin- als durch Ciprofloxacin geschädigt.

Auf die Bedeutung der Inkubationszeit für das Ausmaß der SOS-Induktion weisen auch die Ergebnisse eines Vorversuchs für die Optimierung des In-vivo-Testsystems (*precA-luc*-Reportergenassay) hin (3.2.2.2.4, **Tabelle 3.20**). Z.B. betrug die spezifische Luciferaseaktivität nach 60 min Inkubation von *E. coli* WT mit Ciprofloxacin (0,0039 µg/ml) 3.467 RLU/OD_{546nm} und nach 80 min 5.279 RLU/OD_{546nm}. Darüber hinaus wurde die Zeitabhängigkeit der SOS-Induktion auch in der Literatur beschrieben. Piddock et al. zeigten mit Hilfe eines *precA-lacZ*-Assays, dass die spezifische β-Galactosidaseaktivität nach 60 bzw. 80 min Behandlung von *E. coli* Zellen mit 0,01 µg/ml Norfloxacin von 95 U/ml auf 120 U/ml anstieg (293).

4.2.2.5 Anwendungsmöglichkeiten des In-vivo-Testsystems

Die Gründe für die Entwicklung Fluorchinolon resistenter Bakterien sind vielfältig. Hierzu zählen die ausgeprägte genetische Variabilität von Bakterien (z.B. durch Mutationen), der Einsatz von Fluorchinolonen als präventive Maßnahme zur Infektionsvermeidung bei Mensch (118) und Tier (337), der zum Teil unsachgerechte Gebrauch dieser Antibiotika durch Ärzte, Patienten oder Tierhalter (100, 206, 229), sowie die Verwendung älterer Chinolone mit geringer Aktivität (124). Da aktive Antibiotika im Erdboden, Abwasser und in Oberflächengewässer oder Flusssedimenten nachgewiesen wurden, wird vermutet, dass auch durch die „Kontamination“ der Umwelt mit Antibiotika die Selektion resistenter Bakterien vorangetrieben wird (337). In diesem Zusammenhang ist denkbar, dass resistente Bakterien nicht nur durch Antibiotika selbst, sondern auch durch deren Metaboliten selektiert werden können. Fluorchinolone werden in Mensch und Tier fast vollständig metabolisiert. Durch den Abbau entstehen verschiedene Fluorchinolonmetaboliten, die zusammen mit geringen Mengen der ursprünglichen Substanz über den Urin oder Stuhl ausgeschieden werden (169, 374) und mit dem Abwasser in die Umwelt gelangen. Darüber hinaus sind verschiedene Basidiomyceten-Species zum Abbau von Fluorchinolonen befähigt (401). Zur Selektion Fluorchinolon resistenter Bakterien ist eine antibakterielle Restaktivität von Fluorchinolonmetaboliten notwendig. Um das Risiko einer Selektion Fluorchinolon resistenter Bakterien in der Umwelt abschätzen zu können, ist somit die Ermittlung der antibakterielle Restaktivität von Fluorchinolonmetaboliten erforderlich.

Anhand des Enrofloxacin-Metaboliten, Enrofloxacin-N-4'-oxid, sollte die Eignung des *precA-luc*-Reporterassays für die Messung der antibakteriellen Restaktivität von Fluorchinolonmetaboliten untersucht werden.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten In-vivo-Testsystem (*precA-luc*-Reporterassay) konnte gezeigt werden, dass der Fluorchinolonmetabolit bereits bei 4 µg/ml (MSIC) – also deutlich unterhalb dessen MHK von 32 µg/ml – die SOS-Antwort in *E. coli* WT induziert (3.2.5). Wird der MSIC-Wert von Enrofloxacin-N-4'-oxid mit dem von Enrofloxacin in Beziehung gesetzt, so ergibt sich eine Restaktivität von 0,047%. In einer Studie von Wetzstein wurde der MHK-Wert von Enrofloxacin-N-4'-oxid zu dem von Enrofloxacin ins Verhältnis gesetzt (401). Die dabei erhaltene Restaktivität des Metaboliten (0,09%) ist vergleichbar mit der hier bestimmten. Durch die hohe Sensitivität des In-vivo-Testsystems ist der Nachweis einer antibakteriellen Restaktivität jedoch bereits bei subinhibitorischen Konzentrationen möglich.

Ein weiteres Einsatzgebiet des In-vivo-Testsystems könnte die Ermittlung der antibakteriellen Restaktivität von Zwischenstufen, die während der Synthese von Fluorchinolonen entstehen, sein. Hierdurch könnte das Risiko für das „Herstellungspersonal“ – hinsichtlich einer Selektion resistenter Bakterien durch Synthesezwischenstufen – abgeschätzt werden.

4.2.3 Wechselwirkung von Pradofloxacin mit humaner Topoisomerase II

Typ II-Topoisomerasen gehören zur „Grundausrüstung“ von Bakterien- und eukaryontischen Zellen (1.3). Während die bakteriellen Typ II-Topoisomerasen – Gyrase und Topoisomerase IV – frei im Cytoplasma bzw. an die Cytoplasmamembran von Bakterien gebunden vorliegen, sind eukaryontische Typ II-Topoisomerasen im Zellkern lokalisiert. Unabhängig von deren Lokalisation spielen alle Typ II-Topoisomerasen für die Organisation der DNA eine wichtige Rolle. So sind die bakteriellen Enzyme für die Aufrechterhaltung der kompakten Struktur der ringförmigen Bakterien-DNA notwendig. Entsprechend sind die eukaryontischen Enzyme entscheidend am Aufbau des Chromatins bzw. der Chromosomen beteiligt (55, 194). Wie Gyrase und Topoisomerase IV sind eukaryontische Typ II-Topoisomerasen darüber hinaus für die Änderung der DNA-Topologie während der Replikation, Transkription und Rekombination erforderlich

(274, 314, 371, 409). Bei der Replikation sind die eukaryontischen Enzyme zudem für die Trennung von miteinander verwundenen Tochterchromatiden verantwortlich (55). Diese Aktivität zeigt auch Topoisomerase IV bei der Trennung der bakteriellen Tochterchromosomen am Ende der bakteriellen Replikation. Funktionell weisen eukaryontische Typ II-Topoisomerasen somit eine höhere Homologie zu Topoisomerase IV als zu Gyrase auf. Strukturell sind die eukaryontischen Enzyme – im Gegensatz zu Gyrase und Topoisomerase IV (beides Heterotetramere) – zwar als Homodimere aufgebaut, beim Vergleich der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Enzyme weisen einige Domänen (ATPase-, DNA-Bindungs-, DNA-Cleavage-Domäne) jedoch starke Homologien zueinander auf (55, 217). Pro- und eukaryontische Typ II-Topoisomerasen ähneln sich daher in Bezug auf ihren biochemischen Reaktionsmechanismus (Einführung von DNA-Doppelstrangbrüchen, DNA-Strangpassage, Verschließen des Doppelstrangbruches). Durch die strukturelle Verwandtschaft pro- und eukaryontischer Enzyme besteht generell die Möglichkeit, dass Chinolone nicht nur mit Gyrase und Topoisomerase IV, sondern auch mit eukaryontischen Typ II-Topoisomerasen interagieren. So ergaben Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen eine erhöhte Stabilisierung von eukaryontischen Typ II-Topoisomerase-DNA-Komplexen durch Chinolon-Derivate, wie z.B. CP-115,953 (**4.2.3.2, *Abbildung 4.1***) (91, 309). Die Stabilisierung der Enzym-DNA-Komplexe ging einher mit einer erhöhten Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen. Letztere können mutationsauslösende Ereignisse (Insertionen, Deletionen, Translokationen) (22, 173, 205, 315) sowie Chromosomenbrüche hervorrufen (179), was zu einer irreversiblen Schädigung der eukaryontischen Zelle und zum Zelltod führen kann (173, 205). Chinolone werden für die antibakterielle Therapie in Eukaryonten (Wirtsorganismen) eingesetzt werden. Daher ist es notwendig, die Aktivität neuer Chinolone auf eukaryontische Typ II-Topoisomerasen zu testen, um Hinweise auf mögliche unerwünschte Nebenwirkungen zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Selektivität von Pradofloxacin für Gyrase im Vergleich zu humaner Topoisomerase II mit Hilfe von Cleavage-Assays bestimmt. Diese Tests lassen einen Vergleich der Aktivitäten der Fluorchinolone auf beide Zielstrukturen zu, da jeweils das gleiche molekulare Ereignis – die Stabilisierung von DNA-Doppelstrangbrüchen – bestimmt wird.

4.2.3.1 Eignung des CC_{10} -Wertes für die Bestimmung der Aktivität von Fluorchinolonen auf humane Topoisomerase II

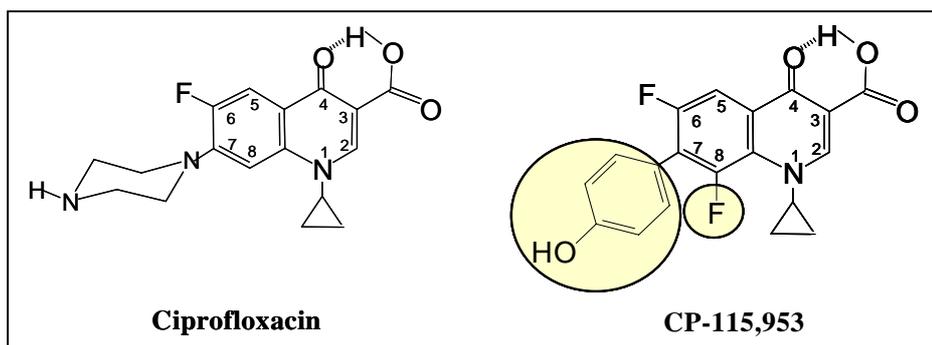
Vor der Durchführung der Cleavage-Assays mit humaner Topoisomerase II wurden die geeigneten Test-Bedingungen (z.B. Pufferzusammensetzung, Reaktionszeit und -temperatur) ermittelt (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde die Enzymmenge bestimmt, die in Abwesenheit von Fluorchinolonen gerade noch in der Lage war, das DNA-Substrat zu relaxieren. Nach der Optimierung der Assay-Bedingungen wurden Standardprotokolle für den Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II erstellt (2.2.2.12.3). Die Auswertung des Assays erfolgte densitometrisch. Zur Ermittlung der Aktivität der einzelnen Substanzen auf humane Topoisomerase II wurde – wie in den Cleavage-Assays mit Gyrase und Topoisomerase IV – die Cleavage-Konzentration 10 (CC_{10}) bestimmt (Definition s. 4.2.1.1). Die Verwendung dieses Parameters ist möglich, da sich mit CC_{10} -Werten ähnliche Aktivitätsunterschiede von Fluorchinolonen, wie z.B. bei Einsatz von CC_{25} -Werten, nachweisen lassen. So wiesen Moxi- und Enrofloxacin sowohl bei Betrachtung der CC_{25} -Werte (je 10 $\mu\text{g/ml}$) als auch der CC_{10} -Werte (je 6 $\mu\text{g/ml}$) eine höhere Aktivität gegenüber humaner Topoisomerase II als Cipro- und Marbofloxacin (CC_{25} -Werte je 25 $\mu\text{g/ml}$, CC_{10} -Werte je 10 $\mu\text{g/ml}$) auf (7.3, Tabellen 7.22, 7.23, 7.26 und 7.27). Da theoretisch nur ein einzelner ternärer Komplex ausreicht, um einen Doppelstrangbruch hervorzurufen und die Zelle irreversibel zu schädigen („single hit event“), stellt der CC_{10} -Wert (minimale Konzentration zur Generierung von DNA-Doppelstrangbrüchen) jedoch ein genaueres Maß für die Aktivität der Fluorchinolone als der CC_{25} -Wert dar.

Die für Pradofloxacin ermittelten CC_{10} -Werte im Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II wurden zunächst mit den Werten weiterer getesteter Fluorchinolone verglichen. Darüber hinaus ließ sich aus der Relation der im Gyrase-Cleavage-Assay ermittelten CC_{10} -Werte zu den mit humaner Topoisomerase II erhaltenen Werten die Selektivität eines Fluorchinolons für eine Zielstruktur ableiten.

4.2.3.2 Aktivität von Pradofloxacin auf humane Topoisomerase II

Aus **Tabelle 3.26 (3.2.6)** kann entnommen werden, dass die Stabilisierung von Komplexen aus humaner Topoisomerase II und DNA durch Fluorchinolonzentralitäten im Bereich von 1 bis 25 µg/ml erfolgte. Die unterschiedlichen Aktivitäten auf das eukaryontische Enzym scheinen vorrangig durch den jeweiligen C7-Substituenten und in geringerem Maße vom C8-Substituenten beeinflusst zu werden. Dies konnte anhand der Fluorchinolone BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin verdeutlicht werden. Diese Substanzen sind für Struktur-Wirkungs-Beziehungen geeignet, da nur ein Unterschied im Substituenten an C8 besteht. In ihrer Aktivität gegenüber humaner Topoisomerase II differierten die Fluorchinolone nur geringfügig voneinander. BayY3118 und Moxifloxacin wiesen einen CC₁₀-Wert von 6 µg/ml auf, Pradofloxacin einen CC₁₀-Wert von 4 µg/ml. Bei Vergleich der CC₁₀-Werte aller getesteten Fluorchinolone zeigten Substanzen mit einem un- bzw. substituierten Piperazinring an C7 (Dano-, Orbi-, Cipro-, Enro- und Marbofloxacin) geringere Aktivitäten gegenüber humaner Topoisomerase II als Substanzen mit einem Pyrrolidinopiperidinring (BayY3118, Moxi- und Pradofloxacin) und diese wiederum geringere Aktivitäten als Substanzen mit einem aromatischen Ring-system (Garenoxacin) oder einem substituierten Pyrrolidinring (Gemifloxacin). Untersuchungen von Elsea et al. über den Einfluss verschiedener C7-Substituenten auf die Aktivität von Chinolon-Derivaten gegenüber Kalbsthymus Topoisomerase II ergaben, dass insbesondere Substanzen mit einem aromatischen C7-Substituenten in der Lage waren, in Anwesenheit des eukaryontischen Enzyms Doppelstrangbrüche hervorzurufen (91). Z.B. benötigte das Chinolon-Derivat CP-115,953, welches im Gegensatz zu Ciprofloxacin (C7-Piperazin, C8-H) einen Hydroxyphenylring an C7 und ein Fluoratom an C8 besitzt (**Abbildung 4.1**), eine Konzentration von 0,1 µg/ml, um 50% des maximalen Cleavage (CC₅₀) hervorzurufen. Diese Konzentration lag um das 500-fache niedriger als die von Ciprofloxacin benötigte Konzentration (50 µg/ml).

Abbildung 4.1: Strukturunterschiede zwischen Ciprofloxacin und CP-115,953



Darüber hinaus konnten Elsea et al. durch gezielten Austausch des C7- bzw. C8-Substituenten zwischen Ciprofloxacin und CP-115,953 zeigen, dass die hohe Aktivität einer Substanz auf Kalbsthymus Topoisomerase II vorrangig vom C7-Substituenten abhängig ist. Während die Aktivität von Difluorociprofloxacin (C8-F, C7-Piperazin) z.B. nur um das 2,4-fache im Vergleich zu Ciprofloxacin (C8-H, C7-Piperazin) zunahm, stieg die Aktivität von CP-115,955 (C8-H, C7-Hydroxyphenyl) bereits um das 38-fache an (91).

Neben der Bestimmung der Aktivität auf humane Topoisomerase II sollte in der vorliegenden Arbeit die Selektivität der Fluorchinolone für pro- und eukaryontische Typ II-Topoisomerasen untersucht werden. Dazu wurden die im Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II ermittelten CC_{10} -Werte zu den mit Gyrase bestimmten CC_{10} -Werten ins Verhältnis gesetzt. Da es bislang keine Studien gibt, in denen sowohl die Cleavage-Konzentrationen (ob als CC_{25} - oder CC_{50} -Wert) von Fluorchinolonen für Gyrase als auch für ein eukaryontisches Enzym bestimmt wurden, ist ein Vergleich mit der hier ermittelten Selektivität nicht möglich. Hingegen gibt es verschiedene Untersuchungen, in denen mit Hilfe von katalytischen Tests sowohl die Hemmung der Enzymaktivität von *E. coli* Gyrase als auch von eukaryontischen Typ II-Topoisomerasen (häufig Kalbsthymus Topoisomerase II, seltener *D. melanogaster* und humane Topoisomerase II) durch Fluorchinolone bestimmt wurde. Ein Vergleich der in den verschiedenen Studien ermittelten inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50} - oder IC_{100} -Wert) für die jeweiligen Enzyme mit den hier bestimmten CC_{10} -Werten für Gyrase und humaner Topoisomerase II ist nicht unmittelbar möglich. Dennoch lassen diese Literaturwerte einen Schluss über die Selektivität von Fluorchinolonen zu einer Zielstruktur zu. Beispielsweise ist aus den

von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelten IC₅₀- oder IC₁₀₀-Werten für Gyrase im Vergleich zu den Werten für Kalbsthymus Topoisomerase II (**Tabelle 4.1**) ersichtlich, dass zur Hemmung des eukaryontischen Enzyms 50- bis 1.192-fach höhere Konzentrationen als zur Inhibierung des prokaryontischen Enzyms notwendig sind (146, 151, 247).

Tabelle 4.1: Publierte Werte für inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀ oder IC₁₀₀) verschiedener Fluorchinolone für Kalbsthymus Topoisomerase II im Vergleich zu *E. coli* Gyrase

Fluorchinolon Enzym, Assay	inhibitorische Konzentration [µg/ml]*			Referenz
	Ciprofloxacin	Ofloxacin	Norfloxacin	
Kalbsthymus Topoisomerase II, Relaxierungs-Assay (IC ₁₀₀)	500	1.700	n.b.	Moreau et al., 1990
<i>E. coli</i> Gyrase, Überspiralisierungs-Assay (IC ₁₀₀)	10	10	n.b.	
Faktor	50	170	n.b.	
Kalbsthymus Topoisomerase II, Catenierungs-Assay (IC ₅₀)	150	1.300	300	Hussy et al., 1986
<i>E. coli</i> Gyrase, Überspiralisierungs-Assay (IC ₅₀)	1	3,1	2,4	
Faktor	150	419	125	
Kalbsthymus Topoisomerase II, Relaxierungs-Assay (IC ₅₀)	155	1.870	n.b.	Hoshino et al., 1989
<i>E. coli</i> Gyrase, Überspiralisierungs-Assay (IC ₅₀)	0,13	0,76	n.b.	
Faktor	1.192	2.461	n.b.	

* Auf Grund bislang fehlender standardisierter Testbedingungen (dazu zählen Puffer- und Inkubationsbedingungen, eingesetzte Enzymkonzentration, untersuchte Enzymaktivität, Angabe der inhibitorischen Konzentration – IC₅₀- oder IC₁₀₀-Wert) ergeben sich bei verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche inhibitorische Konzentrationen für *E. coli* Gyrase bzw. Kalbsthymus Topoisomerase II.

Der Vergleich der in der vorliegenden Arbeit ermittelten CC₁₀-Werte von Gyrase mit denen für humane Topoisomerase II ergaben ähnliche Größenordnungen. Alle getesteten Fluorchinolone benötigten 100- bis 5.000-fach höhere Konzentrationen zur Stabilisierung von Komplexen aus humaner Topoisomerase II und DNA bzw. zur Generierung

von DNA-Doppelstrangbrüchen (3.2.6, *Tabelle 3.26*). Beispielsweise besaß Orbifloxacin eine 5.000-fach, Ciprofloxacin eine 2.000-fach, Pradofloxacin eine 800-fach, Garenoxacin eine 200-fach und Gemifloxacin eine 100-fach höhere Aktivität auf Gyrase als auf das eukaryontische Enzym. Im Gegensatz zu den hier getesteten Fluorchinolonen weisen Chinolon-Derivate mit einem erhöhten toxischen Potential, wie z.B. CP-115,953, nur eine geringfügig höhere Aktivität gegenüber Gyrase auf. So ergaben Untersuchungen von Elsea und Robinson zur Cleavage-Aktivität (CC_{50} -Werte) des Chinolon-Derivats CP-115,953 nur eine 1,3-fach höhere Aktivität dieser Substanz zu Gyrase im Vergleich zu Kalbsthymus Topoisomerase II (91, 310).

Auf Grund der hohen Selektivität von Pradofloxacin und den anderen getesteten Fluorchinolonen für *E. coli* Gyrase ist eine Inhibierung von eukaryontischen Topoisomerasen während einer Therapie nicht zu erwarten. Für eine ganzheitliche Beurteilung des genotoxischen Potentials der Fluorchinolone müssen zusätzliche Untersuchungen mit eukaryontischen Zellen durchgeführt werden (8). Zur Ermittlung des genotoxischen Potentials wird beispielsweise der Chromosomenaberrationstest eingesetzt. In diesem Test werden Eizellen des Goldhamsters (CHO-K5 Zelllinie) oder menschliche Lymphozyten für 20 h mit der zu testenden Substanz inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von Colcemid (Colchicin-ähnliche Verbindung) werden Zellen, die sich in der Metaphase befinden, fixiert. Die Zellen werden mikroskopisch auf Anomalien der Chromosomenstruktur (z.B. Deletionen) untersucht. In einer Studie von Albertini et al. wurden die Fluorchinolone Cipro-, Enro- und Marbofloxacin und das Zytostatikum Merabon auf ihr Potential Chromosomenbrüche hervorzurufen untersucht (8). Hier zeigte sich, dass bei den eingesetzten Konzentrationsbereichen alle Substanzen außer Marbofloxacin Chromosomenbrüche verursachten. Für Cipro- und Enrofloxacin lagen die Konzentrationen bei 200 bzw. 500 µg/ml und somit deutlich höher als für Merabon (2,5 µg/ml). Die untersuchten Fluorchinolone besaßen folglich nur ein geringes genotoxisches Potential. Die Ermittlung des cytotoxischen Potentials von Fluorchinolonen in Bezug auf eukaryontische Zellen erfolgt anhand von Versuchen mit speziellen Zellkulturen, z.B. mit HeLa- (schnell wachsende Karzinomzellen) oder den oben bereits erwähnten CHO-Zellen. Hierbei wird das zu testende Fluorchinolon in verschiedenen Konzentrationen zu je ca. 5×10^3 Zellen/ml gegeben und die Ansätze anschließend für 48 h bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Zellen gewaschen und die Lebendzellzahl bestimmt. Letztere wird mit der Lebendzellzahl einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Konzentra-

tion, die 50% der Zellen abtötet, wird als EC_{50} -Wert angegeben. So betrug die von Lawrence et al. mit Hilfe dieser Methode ermittelten EC_{50} -Werte für Garenoxacin, Cipro- und Moxifloxacin 166 $\mu\text{g/ml}$, 94,2 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 189 $\mu\text{g/ml}$ (192). Im Vergleich dazu betrug der EC_{50} -Wert des Zytostatikums Etoposid in Untersuchungen von Robinson et al. 5 $\mu\text{g/ml}$. Diese Substanz besaß somit ein 19- bis 38-fach höheres cytotoxisches Potential als Garenoxacin, Cipro- und Moxifloxacin (310).

Ungeachtet der Tatsache, dass Geno- und Cytotoxizitätstests für eine umfassende Beurteilung des toxischen Potentials von Fluorchinolonen auf eukaryontische Zellen notwendig sind, stellen die in dieser Arbeit durchgeführten Cleavage-Assays mit humaner Topoisomerase II und Gyrase eine einzigartige Möglichkeit für die Ermittlung der Selektivität von Fluorchinolonen zu einer Zielstruktur in vitro dar. In Cleavage-Assays wird das gleiche molekulare Ereignis – die Stabilisierung von DNA-Doppelstrangbrüchen – bestimmt. Somit kann ein erster Hinweis auf eine eventuell vorhandene Toxizität einer Substanz gewonnen werden. Darüber hinaus sind die hier vorgestellten, optimierten Cleavage-Assays im Gegensatz zu Untersuchungen mit eukaryontischen Zellen schnell durchführbar.

Für eine erfolgreiche Therapie von Infektionen ist eine umfassende Kenntnis der Aktivität eines Fluorchinolons unerlässlich. Die in dieser Arbeit eingesetzten zellulären und molekularbiologischen Testsysteme können zu einer umfassenden Charakterisierung der antibakteriellen und genotoxischen Wirkung von Fluorchinolonen entscheidend beitragen. So liefern die hier durchgeführten Selektionsversuche und Absterbekinetiken wichtige Hinweise über die Fähigkeit von Fluorchinolonen zur Selektion resistenter Bakterien bzw. ihrer Wirkung auf Bakterien in unterschiedlichen physiologischen Stadien. Darüber hinaus kann mit den im Rahmen dieser Arbeit optimierten Cleavage-Assays die Aktivität von Fluorchinolonen auf die bakteriellen Zielstrukturen Gyrase und Topoisomerase IV sowie auf humane Topoisomerase II rasch quantifiziert werden. Des Weiteren ist mit Hilfe des entwickelten In-vivo-Testsystems (*preCA-luc*-Reportersystem) eine sehr sensitive Messung der zur Induktion der SOS-Antwort benötigten Konzentration (< 500 pg/ml) von Fluorchinolonen möglich.

Die erwähnten Methoden wurden zur Charakterisierung der biologischen Aktivität von Pradofloxacin – einem neuen C8-Cyanofluorchinolon – eingesetzt. Pradofloxacin besitzt

eine höhere antibakterielle Wirkung als andere veterinär- oder humanmedizinisch verwendete Fluorchinolone (z.B. Enro- und Marbofloxacin bzw. Cipro- und Moxifloxacin) gegenüber Wildtyp- und Mutantenstämmen (mit Mutationen in den Genen von Gyrase und Topoisomerase IV) von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* sowie gegenüber hochresistenten Stämmen (mit Mutationen in den Genen der Zielstrukturen und verschiedener Regulatoren von Effluxpumpen sowie einer verminderten Porinbildung) von *E. coli*. Die Substanz weist ein geringes Potential zur Selektion resistenter Bakterien auf und ist gegenüber Zellen von Wildtyp- und Mutantenstämmen von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* in unterschiedlichen physiologischen Stadien aktiv. Anhand von isolierten bakteriellen Zielstrukturen von *E. coli* konnte eine höhere Aktivität von Pradofloxacin auf Gyrase als auf Topoisomerase IV nachgewiesen werden. In Wildtyp- und Mutantenstämmen von *E. coli* erfolgte die Induktion der SOS-Antwort durch Pradofloxacin im Vergleich zu anderen gegenüber *E. coli* wirksamen Fluorchinolonen bereits bei geringen subinhibitorischen Konzentrationen. Pradofloxacin ist im Vergleich zu humaner Topoisomerase II 800-fach selektiver für *E. coli* Gyrase. Dieser Wert ist im Bereich der für andere Fluorchinolone ermittelten Selektivität (z.B. Gemifloxacin 100-fach, Danofloxacin 5.000-fach). Auf Grund der hohen Selektivität von Pradofloxacin ist somit eine Inhibierung von eukaryontischen Topoisomerasen während einer Therapie nicht zu erwarten.

4.3 Ausblick

Folgende Untersuchungen können zur Ergänzung der im Rahmen dieser Arbeit getroffenen Aussagen zur Aktivität von Pradofloxacin bzw. anderer Fluorchinolone beitragen:

- Zur Aufklärung der hohen Aktivität von Pradofloxacin gegenüber hochresistenten Stämmen (mit Mutationen in den Genen der Zielstrukturen und verschiedener Regulatoren von Effluxpumpen sowie einer verminderten Porinbildung) von *E. coli* bzw. für die Ermittlung des Einflusses eines gesteigerten Efflux auf die Aktivität der Substanz wäre die Messung der Akkumulation von Pradofloxacin in der bakteriellen Zelle im Vergleich mit weiteren Fluorchinolonen hilfreich.

- Mit Hilfe von In-vitro-Modellen können wechselnde Konzentrationen eines Antibiotikums, wie sie in verschiedenen Geweben oder Körperflüssigkeiten anzutreffen sind, innerhalb eines bestimmten Zeitraums (z.B. über 24 h) simuliert werden. Darüber hinaus können mit Hilfe von In-vitro-Modellen Absterbekinetiken aufgestellt werden. So kann ein Bezug zwischen dem Absterbevorgang von Bakterien in vitro – unter Berücksichtigung eines spezifischen Serumspiegelverlaufs über 24 h (z.B. nach einmaliger oraler Gabe eines Antibiotikums in einer bestimmten Konzentration) – und den Bedingungen im tierischen Organismus hergestellt werden.
Um Erkenntnisse über die antibakterielle Aktivität von Pradofloxacin in vivo gewinnen zu können, sollten Absterbekinetiken von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* mit Hilfe von In-vitro-Modellen unter Berücksichtigung verschiedener Serumspiegelverläufe über 24 h durchgeführt werden. Durch die Entnahme von Proben zu verschiedenen Zeitpunkten (z.B. stündlich zwischen 0 und 12 h, sowie nach 24 h) und der Ausplattierung auf Pradofloxacin haltigen Agarplatten könnte nachgewiesen werden, ob unter den simulierten Bedingungen eine Selektion resistenter Bakterien erfolgt. Solche Versuche könnten Aufschluss über eine optimale Dosierung von Pradofloxacin geben und somit zu einer verminderten Resistenzentwicklung während einer Therapie beitragen.
- Infektionen der Harnwege oder der Konjunktiva (Bindehaut) werden häufig durch Biofilm bildende Bakterien verursacht. Auf Grund des reduzierten Metabolismus und des verlangsamten Wachstums Biofilm bildender Bakterien bzw. der kompakten Struktur von Biofilmen sind viele Antibiotika wirkungslos. Da Pradofloxacin das Potential besitzt, teilungsinaktive Bakterien und Bakterien mit einer gehemmten Proteinbiosynthese abzutöten, wäre die Untersuchung der Wirksamkeit der Substanz gegenüber Biofilm bildenden Bakterien von Interesse.
- Die Bestimmung der CC₁₀-Werte von Pradofloxacin in Cleavage-Assays mit isolierten, veränderten (mutierten) Zielstrukturen von *E. coli* und *S. aureus* könnte zum Verständnis der hohen Wirksamkeit der Substanz gegenüber Stämmen von *E. coli* und *S. aureus* mit Mutationen in den Zielstrukturen beitragen.

5. Zusammenfassung

Pradofloxacin – ein neues C8-Cyanofluorchinolon – wurde für die Behandlung bakterieller Infektionen im veterinärmedizinischen Bereich entwickelt. In dieser Arbeit wurde die Aktivität von Pradofloxacin auf pro- und eukaryontische Typ II-Topoisomerasen im Vergleich zu anderen Fluorchinolonen neben der Bestimmung der MHK als „klassischer“ Methode mit Hilfe von Absterbekinetiken, Selektionsversuchen, Cleavage-Assays und einem neuentwickelten In-vivo-Testsystem bestimmt.

Pradofloxacin weist im Vergleich zu Enro-, Marbo-, Cipro- und Moxifloxacin eine höhere antibakterielle Wirkung gegenüber Wildtypstämmen und resistenten Typ II-Topoisomerasemutanten von *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus intermedius* auf. Die Substanz ist darüber hinaus aktiv gegenüber hochresistenten Stämmen von *E. coli* (mit genetisch definierten Mutationen in den Genen der Zielstrukturen und der Regulatoren von Effluxpumpen sowie einer verminderten Porinbildung). Als bevorzugte Zielstruktur von Pradofloxacin in *E. coli* wurde Gyrase bzw. in *S. intermedius* Topoisomerase IV identifiziert.

Pradofloxacin besitzt ein geringes Potential zur Selektion resistenter Bakterien und ist aktiv gegenüber Zellen von *E. coli*, *S. aureus* und *S. intermedius* Wildtyp- und Mutantstämmen in verschiedenen physiologischen Stadien. Beides kann dazu beitragen, eine Resistenzentwicklung während einer Therapie zu verhindern bzw. zu verlangsamen.

In Wildtyp- und isogenen Mutantstämmen von *E. coli* erfolgte die Einleitung des bakteriellen Zelltods – in Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen – durch Pradofloxacin im Gegensatz zu Enro-, Marbo-, Cipro- und Moxifloxacin bereits in Anwesenheit geringerer, subinhibitorischer Konzentrationen. Die Fähigkeit von Pradofloxacin, bakterielle Zellen bereits bei sehr geringen Konzentrationen zu schädigen, stellt eine mögliche Erklärung für die herausragende antibakterielle Wirkung dieser Substanz dar.

Für die antibakterielle Wirkung von Pradofloxacin spielen die C8-Cyanogruppe und der C7-Pyrrolidinopiperidinring vermutlich eine wesentliche Rolle. Beide Substituenten scheinen sowohl für die Aktivität der Substanz auf die bakteriellen Zielstrukturen als auch für eine verringerte Affinität zu Effluxpumpen bzw. eine erleichterte Passage der äußeren Membran gramnegativer Bakterien von Bedeutung zu sein.

Im Vergleich zu humaner Topoisomerase II besitzt Pradofloxacin eine hohe Selektivität für *E. coli* Gyrase (800-fach). Bei Einsatz physiologischer Konzentrationen von Pradofloxacin während der Therapie bakterieller Infektionen ist eine Hemmung von eukaryontischen Topoisomerasen somit nicht zu erwarten.

Das in dieser Arbeit neu entwickelte In-vivo-Testsystem (*precA-luc*-Reporterassay) erlaubt eine empfindliche Detektion von Substanzkonzentrationen, die zur Induktion der SOS-Antwort führen. Es kann somit für ein sensitives Screening nach Substanzen eingesetzt werden, die über eine Hemmung der Replikation oder auch eine direkte Wechselwirkung mit der DNA die SOS-Antwort induzieren. Darüber hinaus eignet sich das Testsystem zur Ermittlung der antibakteriellen Restaktivität von Fluorchinolonmetaboliten. Dies konnte am Beispiel von Enrofloxacin-N-4'-oxid demonstriert werden. Die Ermittlung der antibakteriellen Restaktivität erscheint sinnvoll, da durch Fluorchinolonmetaboliten mit einer antibakteriellen Restaktivität theoretisch die Selektion Fluorchinolon resistenter Bakterien möglich ist.

Summary

Pradofloxacin – a new C8-cyanofluoroquinolone – has been developed for the treatment of bacterial infections in veterinary medicine. In this study the activity of pradofloxacin against both, pro- and eukaryotic typ II topoisomerases was determined by MIC determination as “conventional” method, kill-kinetics, the ability to select resistant mutants, cleavage-assays, and a new developed in-vivo-test system compared to other fluoroquinolones.

Pradofloxacin efficiently kills wildtyp strains and resistant typ II topoisomerase mutants of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* compared to enro-, marbo-, cipro- und moxifloxacin. In addition, pradofloxacin is active against high-level resistant mutants of *E. coli* with genetically defined mutations in the genes of the target enzymes and different regulators of efflux pumps and decreased expression of porins.

Gyrase and topoisomerase IV were identified as primary targets of pradofloxacin in *E. coli*, and *S. intermedius*, respectively.

Pradofloxacin possesses a low potential to select resistant mutants and is able to kill cells of *E. coli*, *S. aureus* and *S. intermedius* wildtype and mutant strains in different physiological stages. These properties could help to prevent or at least minimize the development of resistant mutants during therapy.

In wildtype and resistant isogenic mutants of *E. coli*, bacterial cell death – as a result of DNA double strand breaks – occurs at concentrations of pradofloxacin much lower than those determined for enro-, marbo-, cipro- and moxifloxacin and far below the MIC. The ability of pradofloxacin to injure bacterial cells at lowest concentrations convincingly explains the superior antibacterial activity of the drug.

Probably, the C8-cyano- and C7-pyrrolidinopiperidin substituents play a critical role for the antibacterial activity of pradofloxacin. Both substituents seem to be important for the high activity against the bacterial target enzymes as well as the reduced affinity for efflux pumps and permeability of the outer membrane of gram-negative bacteria.

Pradofloxacin is highly selective for *E. coli* gyrase (800-fold) compared to human topoisomerase II. During treatment of bacterial infections with physiological concentrations of pradofloxacin inhibition of eukaryotic topoisomerases should not occur.

The newly developed in-vivo-test system (*preCA-luc* reporter gene assay) allows for a highly sensitive detection of those drug concentrations leading to the induction of the SOS regulon. It can be used to screen for compounds which induce the SOS-response due to either an inhibition of the DNA replication or a direct interaction with DNA. Moreover, the in-vivo-test system is suitable to investigate the residual antibacterial activity of fluoroquinolone metabolites. This could be demonstrated with enrofloxacin-N-4'-oxide as an example for fluoroquinolone metabolites with a residual antibacterial activity which could select fluoroquinolone resistant bacteria in the environment. So it seems to be efficient to determine the residual antibacterial activity of fluoroquinolone metabolites.

6. Literatur

1. **Aarestup, F. M.** 1995. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb. Drug Resist.* **1**:255-257.
2. **Aarestup, F. M., P. Aherns, M. Madsen, L. V. Paleesen, R. L. Poulsen, and H. Westin.** 1996. Glycopeptide susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the vanA cluster. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1938-1940.
3. **Abraham, E. P., and E. Chain.** 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **146**:837-837.
4. **Abu Mraheil, M.** 1999. Entwicklung eines Luciferase-Reportergensystems zur Bestimmung des Superspiralisierungsgrades in Bakterien. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
5. **Acar, J. F., and F. W. Goldstein.** 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* **24**(Suppl. 1):67-73.
6. **Ackermann, G., R. Schumann, B. Pless, M. C. Claros, E. J. Goldstein, and A. C. Rodloff.** 2000. Comparative activity of moxifloxacin in vitro against obligatory anaerobic bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**(3):228-232.
7. **Adachi, T., M. Mizuuchi, E. A. Robinson, E. Appella, M. H. O'Dea, M. Gellert, and K. Mizuuchi.** 1987. DNA-Sequenz of the *Escherichia coli gyrB* gene: application of a new sequencing strategy. *Nucleic Acid Res.* **15**(2):771-784.
8. **Albertini, S., A.-A. Chételat, B. Miller, W. Muster, E. Pujudas, R. Strobel, and E. Gocke.** 1995. Genotoxicity of 17 gyrase- and four mammalian topoisomerase II-poisons in prokaryotic and eukaryotic test systems. *Mutagenesis* **10**(4):343-351.
9. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2067-2075.
10. **Ali Azam, T., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda, and A. Ishihama.** 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* **181**:6361-6370.
11. **Allaker, R. P., D. H. Lloyd, and R. M. Bailey.** 1992. Population size and frequency of staphylococci at mucocutaneous sites on healthy dogs. *Vet. Rec.* **130**(14):303-304.
12. **Allaker, R. P. D. H. Lloyd, and A. I. Simpson.** 1992. Occurrence of *Staphylococcus intermedius* on hair and skin of normal dogs. *Res. Vet. Sci.* **52**(2):174-176.
13. **Anderson, D. G., and S. C. Kowalczykowski.** 1998. Reconstitution of an SOS response pathway: derepression of transcription in response to DNA breaks. *Cell* **95**:975-979.

14. **Anderson, V. E., T. D. Gootz, and N. Osheroff.** 1998. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *J. Biol. Chem.* **273**:17879-17885.
15. **Andersson, M. I., and A. P. MacGowan.** 2003. Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**(Suppl. S1):1-11.
16. **Aoyama, H., K. Sato, T. Kato, K. Hirai, and S. Mitsuhashi.** 1987. Norfloxacin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Chemother.* **31**:1640-1641.
17. **Appelbaum, P. C., and P. A. Hunter.** 2000. The fluoroquinolone antibactericidals: past, present and future. *J. Antimicrob. Chemother.* **16**:1-15.
18. **Ariza, R. R., S. P. Cohen, N. Bachhawat, S. B. Levy, and B. Demple.** 1994. Repressor mutations in the *marRAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:143-148.
19. **Arnold, G. F., and I. Tessman.** 1988. Regulation of DNA superhelicity by *rpoB* mutations that suppress defective Rho-mediated transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**(9):4266-4271.
20. **Arthur, H. M., and P. B. Eastlake.** 1983. Transcriptional control of the *uvrD* gene of *Escherichia coli*. *Gene* **25**:309-316.
21. **Bagel, S., V. Hüllen, B. Wiedemann and P. Heisig.** 1999. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**(4):868-875.
22. **Baguley, B. C., and L. R. Ferguson.** 1998. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **1400**(1-3):213-222.
23. **Baird, C. L., T. T. Harkins, S. K. Morris, and J. E. Lindsley.** 1999. Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:13685-13690.
24. **Ball, P.** 2000. Adverse drug reactions. p. 19-22. *In*: V. T. Andriole (ed.), *The Quinolones*. Academic Press, London, UK.
25. **Ball, P.** 2000. Moxifloxacin (Avelox): an 8-methoxyquinolone antibacterial with enhanced potency. *Int. J. Clin. Pract.* **54**:329-32.
26. **Ball, P.** 2003. Adverse drug reactions: implications for the development of fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**(Suppl. S1):21-27.
27. **Bardouniotis, R., N. Thaladaka, N. Walsh, M. Dorsey, M. B. Schmid, and N. Kaplan.** 2004. In vitro activities of novel bacterial enoyl-ACP reductase inhibitors. Abstract F-316. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
28. **Barrett, J. F., T. D. Gootz, P. R. McGuirk, C. A. Farrell, and S. A. Sokolowski.** 1989. Use of in vitro topoisomerase II assays for studying quinolone antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**(10):1967-1703.

29. **Barrett, J. F., J. A. Sutcliffe, and T. D. Gootz.** 1990. In vitro assays used to measure the activity of topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**(1):1-7.
30. **Baucheron, S., H. Imberechts, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2002. The AcrAB multidrug transporter plays a major role in high level fluoroquinolone resistance in *Salmonella typhimurium* phage type DT204. *Microb. Drug Res.* **8**:281-289.
31. **Bauernfeind, A.** 1993. Comparative in vitro activities of the new quinolone, BAY y 3118, and ciprofloxacin, sparfloxacin, tosufloxacin, CI-960 and CI-990. *J. Antimicrob. Chemother.* **31**:505-522.
32. **Beaucage, S.L., and R. Iyer.** 1992. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoamidite Approach. *Tetrahedron.* **48**:2223-2311.
33. **Behra-Miellet, J., L. Dubreuil, and E. Jumas-Bilak.** 2002. Antianaerobic activity of moxifloxacin compared with that of ofloxacin, ciprofloxacin, clindamycin, metronidazol and beta-lactams. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **20**(5):366-374.
34. **Berger, J. M.** 1998. Type II DNA topoisomerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**:26-32.
35. **Bergmans, H. E. N., I. M. van Die, and W. P. M. Hoekstra.** 1981. Transformation in *Escherichia coli*: Stages in Process. *J. Bacteriol.* **146**(2):564-570.
36. **Bernard, F. M., and A. Maxwell.** 1994. Interaction between DNA-Gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser83 and Asp87. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(7):1994-2000.
37. **Bertino, J., L. Green, Y. Lin, W. Ribble, K. Gibson, J. M. Bullard, N. Janjic, C. S. Mchenry, and H. G. Dallmann.** 2004. DNA polymerase III holoenzyme (Pol III HE) as a platform for the discovery of new anti-infective agents. Abstract F-1520. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
38. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**:1513-1523.
39. **Bjerke, N. B.** 2004. The evolution: Handwashing to hand hygiene guidance. *Crit. Care Nurs Q.* **27**(3):295-307.
40. **Bjornsti, M. A., and N. Osheroff.** 1999. Introduction to DNA-topoisomerases. *Methods Mol. Biol.* **94**:1-8.
41. **Blanche, F., B. Cameron, F.-X. Bernard, L. Maton, B. Manse, L. Ferrero, N. Ratet, C. Lecoq, A. Goniot, D. Bisch, and J. Crouzet.** 1996. Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *E. coli* type II DNA topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**(12):2714-2720.
42. **Blum, M. D., D. J. Graham, and C. A. McCloskey.** 1994. Temafloxacin syndrome: review of 95 cases. *Clin. Infect. Dis.* **18**:946-950.
43. **Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Green, M. C. Beutlach, H. L. Heyneker, H.W. Boyer, S. Crosa, and S. Falkow.** 1977. Construction and characterisation of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.

44. **Bornstein, I., J. Fortin, P. E. Stanley, G. S. Stewart, and L. Krica.** 1994. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anual Biochem.* **219**(2):169-181.
45. **Brandis, H., and G. Pulverer.** 1988. Die Familie der Micrococcaceae. S. 280-289. *In:* H. Brandis, G. Pulverer, Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
46. **Brandis, H., and G. Pulverer.** 1988. Die Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Hafnia* und *Edwardsiella*. S. 333-347. *In:* H. Brandis, G. Pulverer, Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
47. **Brent, R., and M. Ptashne.** 1980. The *lexA* gene product repress its own promotor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:1932-1936.
48. **Brent, R., and M. Ptashne.** 1981. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:4204-4208.
49. **Brighty, K. E., and T. D. Gootz.** 2000. Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. p. 33-201. *In:* V. T. Andriole (ed.), *The Quinolones*. Academic Press, London, UK.
50. **Brown, P. O., and N. R. Cozzarelli.** 1979. A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA. *Science* **206**:1081-1083.
51. **Bryan, L. E., and J. Bdard.** 1991. Impermeability to quinolones in gram-positive and gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**(4):232-239.
52. **Buhler, C., J. H. G. Lebbink, C. Bocs, R. Ladenstein, and P. Forterre.** 2001. DNA topoisomerase VI generates ATP-dependent double-strand breaks with two-nucleotide overhangs. *J. Biol. Chem.* **276**(40):37215-37222.
53. **Catten, M. D., S. Breshan, S. Thompson, and R. Chalkly.** 1986. Novobiocin precipitates histones at concentrations normally used to inhibit eukaryotic type II topoisomerase. *Nucleic Acids Res.* **14**(9):3671-3686.
54. **Centres of Disease Control and Prevention.** Control of Infectious Diseases. 1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* **48**(29):621-629.
55. **Champoux, J. J.** 2001. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:369-413.
56. **Chapman, J. S., and N. H. Georgopapadakou.** 1988. Route of quinolone permeation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:438-442.
57. **Chaudhury, A. M., and G. R. Smith.** 1985. Role of *Escherichia coli* RecBCD enzyme in SOS induction. *Mol. Gen. Genet.* **201**:525-528.
58. **Chen, C.-R., M. Malik, M. Snyder, and K. Drlica.** 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosom: quinolone-induced DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* **258**:627-637.

59. **Chen, D., R. Bowater, and D. M. Lilley.** 1994. Topological promoter coupling in *Escherichia coli*: delta topA-dependent activation of the leu-500 promoter on a plasmid. *J. Bacteriol.* **176**(12):3757-3764.
60. **Chou, J. H., J. T. Greenberg, and B. Demple.** 1993. Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J. Bacteriol.* **175**:1026-1031.
61. **Clements, M., F. Coignard, I. Johnson, S. Chandler, S. Palan, A. Waller, J. Wijkmans, and M.G. Hunter.** 2002. Antibacterial activities and characterisation of novel inhibitors of LpxC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1793-1799.
62. **Cohen, S. S., and H. D. Barner.** 1954. Studies on unbalanced growth in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **40**:885-893.
63. **Cohen, M., M. D. Huband, T. D. Gootz, J. Brieland, S. M. Finegan, J. W. Gage, and W. Gibson.** 2004. DK-507k in vitro and in vivo activities compared to garenoxacin (GRN), gatifloxacin (GAT), levofloxacin (LVX), and other antibacterial agents. Abstract F-1950. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
64. **Cohen, M., S. Yoder, M. D. Huband, G. Roland, and C. Courtney.** 1995. In vitro and in vivo activities of clinafloxacin, CI-990 (PD 131112), and PD 138312 versus enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2123-2127.
65. **Cohen, S. N., A. C. Chang, and L. Hsu.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**:2110-2114.
66. **Cohen, S. P., P. Hachler, and S. B. Levy.** 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:1484-1492.
67. **Cohen, S. P., L. M. McMurry, D. C. Hooper, J. S. Wolfson, and S. B. Levy.** 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1318-1325.
68. **Conrad, S. M., K. Oethinger, K. Kaifel, G. Klotz, R. Marre, and W. V. Kern.** 1996. *gyrA* mutations in high-level fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:443-455.
69. **Crisona, N. J., T. R. Strick, D. Bensimon, V. Croquette, and N. R. Cozzarelli.** 2000. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *Escherichia coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev.* **14**:2881-2892.
70. **Cullen, M. E., A. W. Wyke, R. Kuroda, and L. M. Fischer.** 1989. Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:886-894.
71. **Dagert, M., and S. D. Ehrlich.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**:23-28.

72. **Dalhoff, A.** 2001. Comparative in vitro and in vivo activity of the C-8 methoxy quinolone moxifloxacin and the C-8 chlorine quinolone Bay y 3118. *Clin. Infect. Dis.* **32**:16-22.
73. **Davies, J. E.** 1997. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance. p. 15-27. *In: Ciba Found Symposium 207.* (ed.), *Antibiotic resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread.* John Wiley and Sons, Chichester.
74. **Davies, R., A. Markham, and J. A. Balfour.** 1996. Ciprofloxacin. An update review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs* **6**:1019-1074.
75. **Dean, F., M. A. Krasnow, R. Otter, M. M. Matzuk, S. J. Spengler, and N. R. Cozzarelli.** 1982. *Escherichia coli* type-1 topoisomerases: identification, mechanism, and role in recombination. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **47**:769-777.
76. **Deguchi, T., A. Fukuoka, M. Yasuda, M. Nakano, S. Ozeki, E. Kanematsu, Y. Nishino, S. Ishihara, Y. Ban, and Y. Kawada.** 1997. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**(3):699-701.
77. **de Jong, A., and I. Bleckmann.** 2003. Comparative activity of pradofloxacin against clinical canine and feline strains from Germany. Abstract F-419. 43th ICAAC. American Society for Microbiology.
78. **de Wet, J. R., and K. V. Wood.** 1985. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:7870-7873.
79. **de With, K.** 2000. Antibiotikaresistenzen in der Bevölkerung. uni ulm intern Nr. 234 Januar 2000, uni-ulm online.
80. **DiGate, R. J., and K. J. Marians.** 1988. Identification of a potent decatenating enzyme from *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **263**:13366-13373.
81. **DiGate, R. J., and K. J. Marians.** 1989. Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* **264**:17924-17930.
82. **Discotto, L. F., L. E. Lawrence, K. L. Denbleyker, and J. F. Barrett.** 2001. *Staphylococcus aureus* mutants selected by BMS-284756. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3273-3275.
83. **Domagala, J. M.** 1994. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:1793-1799.
84. **Domagala, J. M., L. D. Hanna, C. L. Heifetz, M. P. Hutt, T. F. Mich, J. P. Sanchez, and M. Solomon.** 1986. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. *J. Med. Chem.* **29**:394-404.
85. **Dong, Y., C. Xu, X. Zhao, J. Domagala, and K. Drlica.** 1998. Fluoroquinolone action against mycobacteria: effects of C-8-substituents on growth, survival, and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2978-2984.

86. **Dri, A.-M., and P. L. Moreau.** 1994. Control of the LexA regulon by pH: evidence for a reversible inactivation of the LexA repressor during the growth cycle. *Mol. Microbiol.* **12**(4):621-629.
87. **Drlica, K.** 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **6**(4):425-433.
88. **Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:377-392.
89. **Dual Luciferase™ Reporter 1000 Assay System.** Technical Manual #TM046, Promega Corporation.
90. **Edenberg, H.** 1980. Novobiocin inhibition of simian virus 40 replication. *Nature (Lond.)*. **286**:529-531.
91. **Elsa, S. H., P. R. McGuirk, T. D. Gootz, M. Moynihan, and N. Osheroff.** 1993. Drug features that contribute to the activity of quinolones against mammalian topoisomerase II and cultured cells: correlation between enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage in vitro and cytotoxic potential. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**(10):2179-2186.
92. **Elsa, S. H., N. Osheroff, and J. L. Nitiss.** 1992. Cytotoxicity of quinolones towards eukaryotic cells: identification of topoisomerase II as the primary target for the quinolone CP-115,953 in yeast. *J. Biol. Chem.* **267**:13150-13153.
93. **Emmerson, A. M. and A. M. Jones.** 2003. The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**(Suppl. S1):13-20.
94. **Everett, M. J., Y. F. Jin, V. Ricci, and L. J. V. Piddock.** 1996. Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2380-2386.
95. **Fass, R. J.** 1993. In vitro activity of Bay y 3118, a new quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2348-2357.
96. **Felmingham, D., Y. Tesfaslasie, C. Dencer, and M. J. Robbins.** 2000. The in vitro activity of moxifloxacin against 817 isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected from 27 centres throughout Great Britain and Ireland during the 1997-1998 cold season. p. 49-56. *In: D. Adam, R. Finch (ed), Moxifloxacin in Practice, Vol. 3.*
97. **Fernandes, P. B., R. Menzel, D. J. Hardy, Y. C. Tse-Dinh, A. Warren, and D. A. Elsemore.** 1999. Microbial resistance: novel screens for a contemporary problem. *Med. Res. Rev.* **19**:559-568.
98. **Ferrero, L., B. Cameron, and J. Crouzet.** 1995. Analysis of *gyrA* and *grlA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**(7):1554-1558.
99. **Ferrero, L., B. Cameron, B. Manse, D. Langneaux, J. Crouzet, A. Famechon, and F. Blanche.** 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.* **13**:641-653.
100. **Feucht, C. L., and L. B. Rice.** 2003. An interventional program to improve antibiotic use. *Ann. Pharmacother.* **37**(5):646-651.

101. **Filutowicz, M., and P. Jonczyk.** 1983. The *gyrB* gene product functions in both initiation and chain polymerisation on *Escherichia coli* chromosome replication: suppression of the initiation deficiency in *gyrB*-ts mutants by a class of *rpoB* mutations. *Mol. Gen. Genetics.* **191**:282-287.
102. **Firsov, A. A., S.-N. Vostrov, I. Y. Lubenko, K. Drlica, Y. A. Portnoy, and S. H. Zinner.** 2003. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selecting window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**(5):1604-1613.
103. **Fisher, L. M., J. M. Lawrence, I. C. Josty, R. Hopewell, E. E. C. Margerrison, and M. E. Cullen.** 1989. Ciprofloxacin and the fluoroquinolones. *Am. J. Med.* **87**(Suppl. 5A):2-8.
104. **Foster, P.** 1997. Nonadaptive mutations occur on the F' episome during adaptive mutation conditions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:1550-1554.
105. **Fraatz, K., K. Heinen, R. Krebber, M. Edingloh, and E. Heinen.** 2002. Serum pharmacokinetics of pradofloxacin in dogs after multiple oral administrations at various dosages. Abstract F-570. 42th ICAAC. American Society for Microbiology.
106. **Fresta, M., S. Guccione, A. R. Beccari, P. M. Furneri, and G. Puglisi.** 2002. Combining molecular modelling with experimental methodologies: mechanism of membrane permeation and accumulation of ofloxacin. *Bioorg. Med. Chem.* **10**(12):3871-3889.
107. **Friedberg, E. C., G. C. Walker, and W. Siede.** 1995. DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
108. **Fung-Tomc, J. C., E. Gradelski, L. Valera, B. Kolek, and D. P. Bonner.** 2000. Comparative killing rates of fluoroquinolones and cell wall-active agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1377-1380.
109. **Funnell, B. E., T. A. Baker, and A. Kornberg.** 1987. In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **262**(21):10327-10334.
110. **Furet, Y. X., and J. C. Pechere.** 1990. Usual and unusual antibacterial effects of quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **26**(Suppl. B):7-15.
111. **Gamper, H. B., and J. E. Hearst.** 1982. A topological model for transcription based on unwinding angle analysis of *E. coli* RNA polymerase binary and ternary complexes. *Cell* **29**(1):81-90.
112. **Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, T. Itoh, and J. Tomizawa.** 1977. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:4772-4776.
113. **Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, and H. A. Nash.** 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**:3872-3876.

114. **Gensberg, K, Y. F. Jin, and L. J. V. Piddock.** 1995. A novel *gyrB* mutation in a quinolone-resistant clinical isolate of *Salmonella thyphimurium*. *FEMS Microbiol. Let.* **132**:57-60.
115. **Gootz, T. D., and K. E. Brighty.** 1996. Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance, and clinical aspects. *Med. Res. Rev.* **16**(5):433-486.
116. **Gootz, T. D., R. P. Zaniewski, S. L. Haskell, F. S. Kaczmarek, A. E. Maurice.** 1999. Activities of trovafloxacin compared with those of other fluoroquinolones against purified topoisomerases and *gyrA* and *grrA* mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1845-1855.
117. **Gradelski, E., B. Kolek, D. Bonner, and J. Fung-Tomc.** 2002. Bactericidal mechanism of gatifloxacin compared with other quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:185-188.
118. **Grange, J. D., D. Roulot, G. Pelletier, E. A. Pariente, J. Denis, and O. Ink.** 1998. Norfloxacin primary prophylaxis of bacterial infections in cirrhotic patients with ascites: a double-blind trial. *J. Hepatology.* **29**:430-436.
119. **Grenne, R. T., and S. Schwartz.** 1992. Small antibiotic resistance plasmids in *Staphylococcus intermedius*. *Zentralbl. Bakteriologie.* **276**(3):380-389.
120. **Griggs, D. J., H. Marona, and L. J. V. Piddock.** 2003. Selection of moxifloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* compared with five other fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**(6):1403-1407.
121. **Grillot, A., D. Stamos, T. Grossman, Y. Bi, M. Carver, D. Deininger, J. Drumm, C. Gross, A. Le Tiran, Y. Liao, N. Mani, J. Moore, D. Nicolau, E. Olson, J. Parsons, J. Partaledis, E. Perola, S. Ronkin, Q. Tang, S. Tian, P. Tessier, T. Wang, Y. Wei, H. Zhang, and P. Charifson.** 2004. A new class of dual targeting inhibitors of GyrB and ParE. Abstract F-1951. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
122. **Gudas, L. J., and A. B. Pardee.** 1976. DNA synthesis inhibition and the induction of protein X in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **101**:459-477.
123. **Hallett, P., and A. Maxwell.** 1991. Novel quinolone resistance mutations of *Escherichia coli* DNA gyrase A protein: enzymatic analysis of the mutant proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:335-340.
124. **Hart, C. A., and S. Kariuki.** 1998. Antimicrobial resistance in developing countries. *Brit. Med. J.* **317**:647-650.
125. **Hartsuiker, E., J. Bahler, and J. Kohli.** 1998. The role of topoisomerase II in meiotic chromosome condensation and segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell.* **9**(10):2739-2750.
126. **Hawkey, P. M.** 2003. Mechanism of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**(Suppl. S1):29-35.
127. **Heddle J., and A. Maxwell.** 2002. Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**(6):1805-1815.

128. **Heinzl, S., und K. A. Schmidt.** 2001. Forschungswerkstatt Moxifloxacin. *Chemother. J. Jahrg.* **10**(17):1-6.
129. **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**(4):879-885.
130. **Heisig, P.** 1994. Mechanismen bakterieller Resistenz gegen Antibiotika. *Arzneimitteltherapie. Jahrg.* **12**(7):203-218.
131. **Heisig, P.** 1997. Fluorchinolonecarbonsäuren. *Arzneimitteltherapie. Jahrg.* **15**(1):14-23.
132. **Heisig, P., D. Olsoczki, N. Lehn, and B. Wiedemann.** 1996. Klinische Fluorchinolone-resistenz bei *Escherichia coli*. *Chemother. J. Jahrg.* **5**(4):185-188.
133. **Heisig, P., H. Schedletzky, and H. Falkenstein-Paul.** 1993. Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**(4):696-701.
134. **Heisig, P., and R. Tschorny.** 1994. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**(6):1284-1291.
135. **Hiasa, H., R. J. DiGate, and K. J. Marians.** 1994. Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerase I and III during *oriC* and pBR322 DNA replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**:2093-2099.
136. **Hiasa, H., and K. J. Marians.** 1994. Topoisomerase IV can support *oriC* DNA replication in vitro. *J. Biol. Chem.* **269**:32655-32659.
137. **Hiasa, H., D. O. Yousef, and K. J. Marians.** 1996. DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. *J. Biol. Chem.* **271**:26424-26429.
138. **Higashitani, A., N. Higashitani, and K. Horiuchi.** 1995. A cell division inhibitor SulA of *Escherichia coli* directly interacts with FtsZ through GTP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**:198-204.
139. **Hill, T. M., B. Sharma, M. Valjavec-Gratian, and J. Smith.** 1997. *sfi*-independent filamentation in *Escherichia coli* is *lexA* dependent and requires DNA damage for induction. *J. Bacteriol.* **179**(6):1931-1939.
140. **Hirai, K., H. Aoyama, T. Irikura, S. Iyobe, and S. Mitsuhashi.** 1986. Difference in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:535-538.
141. **Hooper, D. C.** 2001. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* **32**(Suppl. 1):9-15.
142. **Hooper, D. C.** 1999. Mechanism of quinolone resistance. *Drug Resist. Updates.* **2**:38-55.

143. **Hooper, D. C., J. S. Wolfson, M. A. Bozza, and E. Y. Ng.** 1992. Genetics and regulation of outer membrane protein expression by quinolone resistance loci *nfxB*, *nfxC*, and *nfxB*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1151-1154.
144. **Horowitz, D. S., and J. C. Wang.** 1987. Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* **262**:5339-5344.
145. **Hoshino, K., A. Kitamura, I. Morrissey, K. Sato, and H. Ikeda.** 1994. Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2623-2627.
146. **Hoshino, K., K. Sato, T. Une, and Y. Osada.** 1989. Inhibitory effects of quinolones on DNA gyrase of *Escherichia coli* and topoisomerase II of fetal calf thymus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**(10):1816-1818.
147. **Howard, B. M. A., R. J. Pinney, and J. T. Smith.** 1993. Function of the SOS process in repair of DNA damage induced by modern 4-quinolones. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**:658-662.
148. **Howard, B. M. A., R. J. Pinney, and J. T. Smith.** 1993. 4-Quinolone bactericidal mechanisms. *Drug Res.* **43**(10):1125-1129.
149. **Howard, M. T., S. H. Neece, S. W. Matson, and K. N. Kreuzer.** 1994. Disruption of a topoisomerase-DNA cleavage complex by a DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**(25):12031-12035.
150. **Huisman, O., R. D'Ari, and S. Gottesman.** 1984. Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:4490-4494.
151. **Hussy, P., G. Maass, B. Tummler, F. Grosse, and U. Schomburg.** 1986. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase α primase complex, topoisomerases I and II, and growth of mammalian lymphoblasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:1073-1078.
152. **Ihrke, P. J.** 1996. Experiences with enrofloxacin in small animal dermatology. *Suppl. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* **18**(2):35-39.
153. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**(1):23-28.
154. **Ince, D., and D. C. Hooper.** 2000. Mechanisms and frequency of resistance to premarfloxacin in *Staphylococcus aureus*: novel mutations suggest novel drug-target interactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3344-3350.
155. **Ince, D., and D. C. Hooper.** 2001. Mechanism and frequency of resistance to gatifloxacin in comparison to AM-1121 and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(10):2755-2764.
156. **Ince, D., X. Zhang, and D. C. Hooper.** 2002. Dual targeting of DNA gyrase and topoisomerase IV: target interactions of garenoxacin (BMS-284756, T-381ME), a new desfluoro-quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3370-3380.

157. **Ismail, N. A., A. M. el-Masri, and E. S. el-Denshary.** 1971. Biochemical studies on the hepatotoxicity of novobiocin sodium in rabbits. *J. Egypt Med. Assoc.* **54**(2):91-94.
158. **Ito, T., M. Matsumoto, and T. Nishino.** 1995. Improved bactericidal activity of Q-35 against quinolone-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1522-1525.
159. **Ito, T., M. Otsuki, and T. Nishino.** 1992. In vitro antibacterial activity of Q-35, a new fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1708-1714.
160. **Jacob, F., S. Brenner, and F. Cuzin.** 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**:329-348.
161. **Jaillon, P., J. Morganroth, I. Brumpt, and G. Talbot.** 1996. Overview of electrocardiographic and cardiovascular safety data for sparfloxacin. Sparfloxacin safety group. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**(Suppl. A):161-167.
162. **Janion, C.** 2001. Some aspects of the SOS response system – a critical survey. *Acta Biochim. Polon.* **48**(3):599-610.
163. **Jonas, D., K. Biehler, D. Hartung, B. Spitzmüller, and F. D. Daschner.** 2005. Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in German intensive care units. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(2):773-775.
164. **Jones, M. E., D. F. Sahn, N. Martin, S. Scheuring, P. Heisig, C. Thornsberry, K. Köhrer, and F.-J. Schmitz.** 2000. Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from worldwide surveillance studies during the 1997-1998 respiratory season. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:462-466.
165. **Jones, C., and I. B. Holland.** 1985. Role of SulB (FtsZ) protein in division inhibition during SOS response in *Escherichia coli*: FtsZ stabilizes the inhibitor Sula. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:6045-6049.
166. **Jones, M. E., R. S. Blosser, J. A. Karlowsky, and D. F. Sahn.** 2004. In vitro activity of DX-619, a novel des-fluoro(6)-quinolone, against molecularly characterized *Streptococcus pneumoniae* with reduced susceptibilities to fluoroquinolones. Abstract F-1939. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
167. **Kampranis, S. C., and A. Maxwell.** 1996. Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:14416-14421.
168. **Kampranis, S. C., A. D. Bates, and A. Maxwell.** 1999. A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:8414-8419.
169. **Karabalut, N., and G. L. Drusano.** 1993. Pharmacokinetics of fluoroquinolone antimicrobial agents. p. 195-223. *In*: D. C. Hooper and J. S. Wolfson (ed.), *Quinolone antimicrobial agents*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
170. **Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki.** 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**:393-404.

171. **Kato, J., Y. Nishimura, M. Yamada, H. Suzuki, and Y. Hirota.** 1988. Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:3967-3977.
172. **Kato, J.-I., H. Suzuki, and H. Ikeda.** 1992. Purification and characterization of DNA topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* **267**:25676-25684.
173. **Kaufmann, S. H.** 1998. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**(1-3):195-211.
174. **Kayser, F. H., K. A. Bienz, J. Eckert und R. M. Zinkernagel.** 1998. Probleme der Resistenz. S. 193-196. *In: Medizinische Mikrobiologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
175. **Kern, W. V., M. Oethinger, A. S. Jellen-Ritter, and S. B. Levy.** 2000. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(4):814-820.
176. **Khodursky, A. B., and N. R. Cozzarelli.** 1998. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* **273**(42):27668-27677.
177. **Khodursky, A. B., E. L. Zechiedrich, and N. R. Cozzarelli.** 1995. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:11801-11805.
178. **Kim, B., and J. W. Little.** 1992. Dimerization of a specific DNA binding protein on the DNA. *Science* **255**:203-206.
179. **Kingma, P. S., and N. Osheroff.** 1997. Apurinic sites are position-specific topoisomerase II poisons. *J. Biol. Chem.* **272**(2):1148-1155.
180. **Kirkegaard, K., and J. C. Wang.** 1981. Mapping the topography of DNA wrapped around gyrase by nucleolytic and chemical probing of complexes of unique DNA sequence. *Cell* **23**:721-729.
181. **Kitamura, A., K. Hoshino, Y. Kimura, I. Hayakawa, and K. Sato.** 1995. Contribution of the C-8 substituent of DU-6859a, a new potent fluoroquinolone, to its activity against DNA gyrase mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1467-1471.
182. **Klare, I., D. Badstubner, C. Konstabel, G. Bohme, H. Claus, and W. Witte.** 1999. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from faecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microb. Drug Res.* **5**:45-52.
183. **Klevan, L. and J. C. Wang.** 1980. DNA gyrase-DNA complex containing 140 bp of DNA and an $\alpha_2\beta_2$ protein core. *Biochemistry* **19**:5229-5234.
184. **Klopman, G., D. Fercu, J.-Y. Li, H. S. Rosenkranz, and M. R. Jacobs.** 1996. Antimycobacterial quinolones: a comparative analysis of structure-activity and structure-cytotoxicity relationships. *Res. Microbial.* **147**:86-96.

185. **Knippers, R.** 1998. DNA-Schäden durch ultraviolettes Licht und die Exzisionsreparatur. S. 249-253. *In*: R. Knippers, Molekulare Genetik. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
186. **Körber-Irrgang, B., H. G. Wetzstein, and P. Heisig.** 2004. SOS response induction as a highly sensitive indicator for the bactericidal potency of pradofloxacin. Abstract F-1539. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
187. **Kohlbrenner, W. E., N. Wideburg, D. Weigl, A. Saldivar, and D. T. W. Chu.** 1991. Induction of calf thymus topoisomerase II-mediated DNA breakage by the antibacterial isothiazoloquinolones A-65281 and A-65282. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**(1):81-86.
188. **Kowalczykowski, S. C., D. A. Dixon, A. K. Eggleston, S. D. Lauder, and W. M. Rehrauer.** 1994. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**:401-465.
189. **Kratz, B.** 1998. Ursache und Verbreitung hoher Fluorchinolonresistenz bei *Salmonella typhimurium*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
190. **Kreuzer, K. N, and N. R. Cozzarelli.** 1979. *Escherichia coli* mutants thermosensitive for desoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on desoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J. Bacteriol.* **140**:424-435.
191. **Kwak, J., M. Seol, H. Kim, H. Park, D. Choi, and Y. Jung.** 2004. Bacterial activities of DW-224a, a new fluoroquinolone. Abstract F-1947. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
192. **Lawrence, L. E., P. Wu, L. Fan, K. E. Gouveia, A. Card, M. Casperson, K. Denbleyker, and J. F. Barrett.** 2001. The inhibition and selectivity of bacterial topoisomerases by BMS-284756 and its analogues. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:195-201.
193. **Lecomte, S., M. H. Baron, M. T. Chenon, C. Couprie, and N. J. Moreau.** 1994. Effect of magnesium complexation by fluoroquinolones on their antibacterial properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2810-2816.
194. **Lehninger.** 2001. Gene und Chromosomen. S. 985-1009. *In*: Lehninger, Biochemie. 3. Auflage. Nelson Cox.
195. **Leo, E, K. A. Gould, X.-S. Pan, G. Capranico, M. R. Sanderson, M. Palumbo, and L. M. Fisher.** 2005. Novel symmetric and asymmetric DNA scission determinants for *Streptococcus pneumoniae* topoisomerase IV and gyrase are clustered at the DNA breakage site. *J. Biol. Chem.* **280**(14):14252-14263.
196. **Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, and R. P. Brundage.** 1962. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm. Chem.* **91**:1063-1068.
197. **Levy, S. B.** 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. p. 1-9. *In*: Ciba Found Symposium 207 (ed.), Antibiotic resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. John Wiley and Sons, Chichester.

198. **Lewin,, C. S., and S. G. B. Amyes.** 1990. Bactericidal action of PD 127,391, an enhanced spectrum quinolone. *J. Med. Microbiol.* **33**:67-70.
199. **Lewin,, C. S., S. G. B. Amyes, and J. T. Smith.** 1989. Bactericidal activity of enoxacin and lomefloxacin against *Escherichia coli* KL16. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**:731-733.
200. **Lewin, C. S., B. M. Howard, and J. T. Smith.** 1991. Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. *J. Med. Microbiol.* **34**:19-22.
201. **Lewin, C. S., I. Morrissey, and J. T. Smith.** 1991. The mode of action of quinolones: the paradox in activity of low and high concentrations and activity in anaerobic environment. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **10**(4):240-248.
202. **Lewin, C.S., and J. T. Smith.** 1988. Bactericidal mechanisms of ofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* **22** (Suppl C):1-8.
203. **Lewis, K.** 2000. Programmed death in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(3):503-514.
204. **Lewis, L. K., G. R. Harlow, R. A. Gregg-Jolly, and D. W. Mount.** 1994. Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage inducible genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **241**:507-523.
205. **Li, T. K., and L. F. Lu.** 2001. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**:53-77.
206. **Lieberman, J. M.** 2003. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**(12):1143-1151.
207. **Lipsky, B. A., and C. A. Baker.** 1999. Fluoroquinolone toxicity profiles: a review focussing on newer agents. *Clin. Infect. Dis.* **28**(2):352-364.
208. **Little, J. W.** 1993. LexA cleavage and other self-processing reactions. *J. Bacteriol.* **175**(16):4943-4950.
209. **Liu, L., C.-C. Liu, and B. Alberts.** 1980. Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell* **19**:697-707.
210. **Liu, L. F., and J. C. Wang.** 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**(20):7024-7027.
211. **Lottspeich, F. und H. Zorbas.** 1998. Färbemethoden. S. 653-654. *In*: F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
212. **Lu, T., X. L. Zhao, and K. Drlica.** 1999. Gatifloxacin activity against quinolone-resistant gyrase: allele-specific enhancement of bacteriostatic and bactericidal activities by the C-8-methoxy group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2969-2974.
213. **Lu, T., X. Zhao, X. Li, A. Drlica-Wagner, J. Y. Wang, and J. Domagala.** 2001. Enhancement of fluoroquinolone activity by C-8 halogen and methoxy moieties: action

- against a gyrase resistance mutant of *Mycobacterium smegmatis* and a gyrase-topoisomerase IV double mutant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2703-2709.
214. **Lusetti, L. S., J. J. Shaw, and M. M. Cox.** 2003. Magnesium ion-dependent activation of the RecA protein involves the C terminus. *J. Biol. Chem.* **278**(18):16381-16388.
215. **Luttinger, A.** 1995. The twisted 'life' of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. *Mol. Microbiol.* **15**(4):601-606.
216. **Luttinger, A. L., A. L. Springer, and M. B. Schmid.** 1992. A cluster of genes that affects nucleoid segregation in *Salmonella typhimurium*. *New Bio.* **3**(7):687-697.
217. **Lynn, R., G. Giaever, and S. L. Swanberg, J. C. Wang.** 1986. Tandem regions of yeast DNA topoisomerase II share homology with different subunits of bacterial gyrase. *Science* **233**:647-649.
218. **Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* **19**:101-112.
219. **Mammeri, H., M. van de Loo, L. Poirel, L. Martinez-Martinez, and P. Nordmann.** 2005. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(1):71-76.
220. **Man, I., J. Murphy, and J. Ferguson.** 1999. Fluoroquinolone phototoxicity: a comparison of moxifloxacin and lomefloxacin in normal volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**(Suppl. B):77-82.
221. **Mandell, G. L., and W. A. Jr. Petri.** 1996. Penicillins, cephalosporins and other β -lactam antibiotics. p. 1073-1101. *In: J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff et al., Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* 9th ed. New York: McGraw-Hill.
222. **Maneewannakul, K., and S. B. Levy.** 1996. Identification of *mar* mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**(7):1695-1698.
223. **Mani, N., D. Stamos, A. Grillot, J. Parsons, C. Gross, P. Charifson, and T. Grossman.** 2004. Dual-targeting of bacterial type II topoisomerases by a novel class of antibacterial compounds. Abstract F-1952. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
224. **Maniatis, T., E. F. Frisch, and J. Sambrook.** 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
225. **Marians, K. J., and H. Hiasa.** 1997. Mechanism of quinolone action. *J. Biol. Chem.* **272**(14):9401-9409.
226. **Marians, K. J., J. S. Minden, and C. Parada.** 1986. Replication of superhelical DNAs in vitro. *Prog. Nucleic Acid Res.* **33**:111-140.

227. **Marrot, L., and C. Agapakis-Causse.** 2000. Differences in the photogenotoxic potential of two fluoroquinolones as shown in diploid yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*) and supercoiled plasmid DNA. *Mutat. Res.* **468**(1):1-9.
228. **Martens, R., H.-G. Wetzstein, F. Zadrazil, M. Capelari, P. Hoffmann, and N. Schmeer.** 1996. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by wood-rotting fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(11):4206-4209.
229. **Martin, C., and J. L. Pourriat.** 1998. Quality of perioperative antibiotic administration by French anaesthetists. *J. Hosp. Infect.* **40**(1):47-53.
230. **Martin, R. G., K. W. Jair, R. E. Wolf Jr., and J. L. Rosner.** 1996. Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**(8):2216-2223.
231. **Martin, R. G., P. S. Nyantakyi, and J. L. Rosner.** 1995. Regulation of the multiple antibiotic resistance (*mar*) regulon by *marORA* sequences in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **177**(14):4176-4178.
232. **Martin, R. G., and J. L. Rosner.** 1995. Binding of purified multiple antibiotic resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:5456-5460.
233. **Martínez-Martínez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797-799.
234. **Mascaretti, O. A.** 2003. Compounds that interfere with tetrahydrofolic acid biosynthesis. p. 319-328. *In: Bacteria versus antibacterial agents.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
235. **Mascaretti, O. A.** 2003. Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV – Quinolones. p. 295-309. *In: Bacteria versus antibacterial agents.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
236. **Mascellino, M. T., S. Farinelli, F. Iegri, and E. Iona.** 1998. The influence of the SOS response on the activity of 4-quinolones and zidovudine against some strains of enterobacteria. *Microbiologica* **21**:31-40.
237. **Maxwell, A.** 1997. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* **5**(3):102-109.
238. **Mayer, S.** 2002. Wirksamkeit neuer Chinolone gegen grampositive Kokken: Epidemiologie und potentielle Resistenzentwicklung. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
239. **Mayr, A.** 1993. Staphylococcus. S. 688-699. *In: Rolle/Mayr, Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
240. **Mayr, A.** 1993. Sulfonamide und andere antimetabolisch wirkende Präparate. S. 99-101. *In: Rolle/Mayr, Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

241. **Mazzariol, A, Y. Tokue, T. M. Kanegawa, G. Cornaglia, and H. Nikaido.** 2000. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(12):3441-3443.
242. **Medlau, L., R. E. Long, J. Brown, and W. H. Miller.** 1986. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. *Am. J. Vet. Res.* **47**(2):229-231.
243. **Merrifield, R. B.** 1963. Solid phase peptide synthesis I: The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2149-2154.
244. **Miller, K. G., L. F. Liu, and P. T. Englund.** 1981. A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *J. Biol. Chem.* **256**(17):9334-9339.
245. **Mitsuyama, J., Y. Itoh, M. Takahata, S. Okamoto, and T. Yasuda.** 1992. In vitro antibacterial activities to tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2030-2036.
246. **Mizuuchi, K., M. Gellert, and H. A. Nash.** 1978. Involvement of supercoiled DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* **121**(3):375-392.
247. **Moreau, N. J., H. Robaux, L. Baron, and X. Tabary.** 1990. Inhibitory effects of quinolones on pro- and eukaryotic DNA topoisomerases I and II. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**(10):1955-1960.
248. **Morraes-Cabral, J. H., A. P. Jackson, C. V. Smith, N. Shikotra, A. Maxwell, and R. C. Liddington.** 1997. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* **388**:903-906.
249. **Morris, S. K., T. T. Harkins, R. B. Tennyson, and J. E. Lindsley.** 1999. Kinetic and thermodynamic analysis of mutant type II DNA topoisomerases that cannot covalently cleave DNA. *J. Biol. Chem.* **274**(6):3446-3452.
250. **Morris, S. K., and J. E. Lindsley.** 1999. Yeast topoisomerase II is inhibited by etoposide after hydrolyzing the first ATP and before releasing the second ADP. *J. Biol. Chem.* **274**(43):30690-30696.
251. **Morrissey, I.** 1996. Bactericidal activity of trovafloxacin (CP-99,219). *J. Antimicrob. Chemother.* **38**:1061-1066.
252. **Morrissey, I.** 1997. Bactericidal index: a new way to assess quinolone bactericidal activity in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:713-717.
253. **Morrissey, I., and J. T. Smith.** 1995. Bactericidal activity of the new 4-quinolones DU-6859a and DU-7751a. *J. Med. Microbiol.* **43**:4-8.
254. **Mülhardt, C.** 2002. Klonierung von PCR-Produkten. *In: Der Experimentator. C. Mülhardt, Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.*
255. **Munoz, R., and A. G. De La Campa.** 1996. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is the primary target of fluoroquinolones and cooperates with

- DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2252-2257.
256. **M'Zali, F. H., P. M. Hawkey, and A. Dalhoff.** 1999. Differential selection of quinolone resistance by new quinolones in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. p. 61-69. *In*: D. Adam and R. G. (ed.) Moxifloxacin in Practice. Maxim Medical, Oxford, UK.
257. **Nagase, N., A. Sasaki, K. Yamashita, A. Shimuzu, Y. Wakita, S. Kitai, and J. Kawano.** 2001. Isolation and species distribution of Staphylococci from animal and human skin. *J. Vet. Med. Sci.* **64**(3):245-250.
258. **Nakamura, S., M. Nakamura, T. Kojima, and H. Yoshida.** 1989. *GyrA* and *gyrB* mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:254-255.
259. **Nash, H. A.** 1990. Bending and supercoiling of DNA at the attachment site of bacteriophage lambda. *Trends Biochem. Sci.* **15**(6):222-227.
260. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2004. Document M100-S14. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
261. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
262. **New Scientist.** Online news, 26. 9. 2000.
263. **Newton, C. R., and A. Graham.** 1994. Primer. *In*: C. R. Newton, A. Graham, PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
264. **Ng, E. Y., M. Trucksis, and D. C. Hooper.** 1996. Quinolone resistance mutations in topoisomerase IV: relationship to the *flqA* locus and genetic evidence that topoisomerase IV is the primary target and DNA gyrase is the secondary target of fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1881-1888.
265. **Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:5833-5839.
266. **Noble, C. G., and A. Maxwell.** 2002. The role of GyrB in the DNA cleavage-reaction of DNA gyrase: a proposed two metal-ion mechanism. *J. Mol. Biol.* **318**(2):361-371.
267. **Oethinger, M., I. Podglajen, W. V. Kern, and S. B. Levy.** 1998. Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2089-94.
268. **Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pumps plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* **178**:306-308.
269. **Opel, M. L., S. M. Arfin, and G. W. Hatfield.** 2001. The effects of DNA supercoiling on the expression of operons of the *ilv* regulon of *Escherichia coli* suggest a

- physiological rationale for divergently transcribed operons. *Mol. Microbiol.* **39**(5):1109-1115.
270. **Oram, M. and L. M. Fisher.** 1991. 4-quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:387-389.
271. **Orr, E., N. F. Fairweather, I. Holland, and R. Pritchard.** 1979. Isolation and characterization of a strain carrying a conditional lethal mutation in the *cou* gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **177**:103-112.
272. **Osheroff, N.** 1989. Biochemical basis for the interaction of type I and type II topoisomerases with DNA. *Pharmacol. Ther.* **41**:223-241.
273. **Osheroff, N., E. R. Shelton, and D. L. Brutlag.** 1983. DNA topoisomerase-II from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **258**:9536-9543.
274. **Osheroff, N., E. L. Zechiedrich, and K. C. Gyale.** 1991. Catalytic function of DNA topoisomerase II. *BioEssays* **13**:269-275.
275. **Otter, R., and N. R. Cozzarelli.** 1983. *Escherichia coli* DNA-gyrase. *Methods Enzymol.* **100**:171-180.
276. **Owens, R. C. Jr.** 2004. QT prolongation with antimicrobial agents: understanding the significance. *Drugs* **64**(10):1091-1124.
277. **Page, M. G. P.** 2000. β -Lactamase inhibitors. *Drug Resist. Update.* **3**:109-125.
278. **Palù, G., S. Valisena, G. Ciarrocchi, B. Gatto, and M. Palumbo.** 1992. Quinolone binding to DNA is mediated by magnesium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:9671-9675.
279. **Pan, X.-S., J. Ambler, S. Methar, and L. M. Fisher.** 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2321-2326.
280. **Pan, X.-S., and L. M. Fisher.** 1997. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:471-474.
281. **Pan, X.-S., and L. M. Fisher.** 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2810-2816.
282. **Pan, X.-S., and L. M. Fisher.** 1999. *Streptococcus pneumoniae* DNA gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1129-1136.
283. **Pan, X.-S., G. Yague, and L. M. Fisher.** 2001. Quinolone resistance mutations in *Streptococcus pneumoniae* GyrA and ParC proteins: mechanistic insights into quinolone action from enzymatic analysis, intracellular levels, and phenotypes of wild-type and mutant proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(11):3140-3147.

284. **Park, Y.-H., J.-H. Yoo, D.-H. Huh, Y.-K. Cho, J.-H. Choi, and W.-S. Shin.** 1998. Molecular analysis of fluoroquinolone-resistance in *Escherichia coli* on the aspect of gyrase and multiple antibiotic resistance (*mar*) genes. *Yonsei Med. J.* **39**(6):534-540.
285. **Pavlicek, J. W., W. A. Oussatcheva, R. R. Sinden, V. N. Potaman, O. F. Sankey, and Y. L. Lyubchenko.** 2004. Supercoiling-induced DNA bending. *Biochemistry* **43**(33):10664-10668.
286. **Pedersen, K., and H. C. Wegener.** 1995. Antimicrobial susceptibility and rRNA gene restriction patterns among *Staphylococcus intermedius* from healthy dogs and from dogs suffering from pyoderma or otitis externa. *Acta Vet. Scand.* **36**(3):335-342.
287. **Peng, H., and K. J. Marians.** 1993. Decatenation activity of topoisomerase IV during *oriC* and pBR322 DNA replication in vitro. *J. Biol. Chem.* **90**:8571-8575.
288. **Peng, H., and K. J. Marians.** 1993. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interaction. *J. Biol. Chem.* **268**:24481-24490.
289. **Peng, H., and K. J. Marians.** 1995. The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. *J. Biol. Chem.* **270**:25286-25290.
290. **Pestrova, E., R. Beyer, and N. P. Cianciotto.** 1999. Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2000-2004.
291. **Pfeiffer, E. S., and H. Hiasa.** 2004. Replacement of ParC α 4 helix with that of GyrA increases the stability and cytotoxicity of topoisomerase IV-quinolone-DNA ternary complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(2):608-611.
292. **Phillips, I., E. Culebras, F. Moreno, and F. Baquero.** 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**:631-638.
293. **Piddock, L. J. V., and R. Wise.** 1987. Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiol. Let.* **41**:289-294.
294. **Pierfitte, C., R. J. Royer, N. Moore, and B. Begaud.** 2000. The link between sunshine and phototoxicity of sparfloxacin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **49**(6):609-612.
295. **Proctor, R. A., B. Kahl, C. von Eiff, P. E. Vaudaux, D. P. Lew, and G. Peters.** 1998. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin. Infect. Dis.* **27**(Suppl. 1):68-74.
296. **Promega.** 1998. Sequence of pGEM-luc DNA. *In: Promega online Katalog. pGem-luc DNA. Instructions for use of product E1541.*
297. **Pruss, G. J., and K. Drlica.** 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**(4):521-523.
298. **Pruss, G. J., S. H. Manes, and K. Drlica.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**:35-42.

299. **Ramon, M. S., E. Canton, J. Peman, A. Pastor, and J. P. Martinez.** 1999. Mechanisms of action of quinolones against staphylococci and relationship with their in vitro bactericidal activity. *Chemotherapy* **45**:175-182.
300. **Ratcliff, N. T., and J. T. Smith.** 1985. Norfloxacin has a novel bactericidal mechanism unrelated to that of other 4-quinolones. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**(Suppl.):92.
301. **Read, R. C.** 2000. Clinical overview: moxifloxacin in community respiratory tract infections. p. 1-14. *In*: D. Adam, R. Finch (ed), *Moxifloxacin in Practice*, Vol. 3.
302. **Reck, F., S. Marmor, S. Fisher, and M. A. Wuonola.** 2001. Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurC. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**:1451-1454.
303. **Reece, R. J., and A. Maxwell.** 1991. DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**(3/4):335-375.
304. **Reece, R. J., and A. Maxwell.** 1991. The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.* **19**:1399-1405.
305. **Reeve, C. A., P. S. Amy, and A. Martin.** 1984. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **160**:1041-1046.
306. **Renau, T. E., J. W. Gage, J. A. Dever, G. E. Roland, E. T. Joannides, M. Shapiro, J. P. Sanchez, S. J. Gracheck, J. M. Domagala, M. R. Jacobs, and R. C. Reynolds.** 1996. Structure-activity relationships of quinolone agents against mycobacteria: effect of structural modifications at the 8 position. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2363-2368.
307. **Reznikoff, W. S.** 1992. Catabolite gene activator protein activation of *lac* transcription. *J. Bacteriol.* **174**(3):655-658.
308. **Richtlinien der europäischen Union.** Online. www.europa.eu.int.
309. **Robinson, M. J., B. A. Martin, T. D. Gootz, P. R. McGuirk, M. Moynihan, J. A. Sutcliffe, and N. Osheroff.** 1991. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* **266**(22):14585-14592.
310. **Robinson, M. J., B. A. Martin, T. D. Gootz, P. R. McGuirk, and N. Osheroff.** 1992. Effects of novel fluoroquinolones on the catalytic activities of eukaryotic topoisomerase II: influence of the C-8 fluorine group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:751-756.
311. **Robinson, M. J., and N. Osheroff.** 1991. Effects of antineoplastic drugs on the post-strand-passage DNA cleavage/religation equilibrium of topoisomerase II. *Biochemistry* **30**:1807-1813.
312. **Roca, J., and J. C. Wang.** 1994. DNA transport by a type II DNA topoisomerase – evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell* **77**:609-616.
313. **Rodríguez, A. C., and D. Stock.** 2002. Crystal structure of reverse gyrase: insights into the positive supercoiling of DNA. *EMBO J.* **21**(3):418-426.
314. **Rose, D., W. Thomas, and C. Holm.** 1990. Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II. *Cell* **60**:1009-1017.

315. **Rowley, J. D.** 1998. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu. Rev. Genet.* **32**:495-519.
316. **Roychoudhury, S., T. L. Twinem, K. M. Makin, E. J. McIntosh, B. Ledoussal, and C. E. Catrenich.** 2001. Activity of non-fluorinated quinolones (NFQs) against quinolone-resistant *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**(1):29-36.
317. **Rubinstein, E.** 2001. History of quinolones and their side effects. *Chemother.* **47**(Suppl. 3):3-8.
318. **Ruiz, J.** 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1109-1117.
319. **Ruiz, J., S. Casellas, M. T. Jiménez de Anta, and J. Vila.** 1997. The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**:839-840.
320. **Ruiz, J., J. Gomez, M. M. Navia, A. Ribera, J. M. Sierra, and F. Marco.** 2002. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **42**:257-261.
321. **Ruiz, J., F. Marco, P. Goni, F. Gallardo, J. Mensa, A. Trilla, T. Jiménez de Anta, and J. Vila.** 1995. High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**:737-738.
322. **Ryder, N. S., J. Dzink-Fox, B. Kubik, W. Mlineritsch, S. Alvarez, K. Bracken, K. Dean, R. Jain, A. Sundaram, B. Weidmann and Z. Yuan.** 2004. LBM415, a new peptide deformylase inhibitor with potent in vitro activity against drug-resistant bacteria. Abstract F-1959. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
323. **Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim.** 1995. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
324. **Sancar, A., G. B. Sancar, W. D. Rupp, J. W. Little, and D. W. Mount.** 1982. *LexA* protein inhibits transcription of the *E. coli uvrA* gene in vitro. *Nature (Lond.)* **298**:96-98.
325. **Sancar, A., C. Stachelek, W. Konigsberg, and W. D. Rupp.** 1980. Sequence of the *recA* gene and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:2611-2615.
326. **Sanders, C. C.** 1988. Ciprofloxacin: in vitro activity, mechanism of action, and resistance. *Rev. Infect. Dis.* **10**(3):516-527.
327. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-5467.
328. **Sassanfar, M., and J. W. Roberts.** 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *J. Mol. Biol.* **212**:79-96.

329. **Schedletzky, H., B. Wiedemann, and P. Heisig.** 1999. The effect of moxifloxacin on its target topoisomerase from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**(Suppl. B):31-37.
330. **Schmid, M. B.** 1990. A locus affecting nucleoid segregation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**:5416-5424.
331. **Schnarr, M., P. Oertel-Buchheit, M. Kazmaier, and M. Granger-Schnarr.** 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochemie* **73**:423-431.
332. **Schofield, M. A., R. Agbunag, M. L. Michaels, and J. H. Miller.** 1992. Cloning and sequencing of *Escherichia coli mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. *J. Bacteriol.* **174**:5168-5170.
333. **Schulte, A.** 2001. Stabilität hoher Fluorchinolonresistenz bei Enterobakterien ohne Selektionsdruck. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
334. **Senior, D. V.** 1996. The use of enrofloxacin in the management of urinary tract infections in dogs and cats. *Suppl. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* **18**(2):89-95.
335. **Seoane, A., and S. B. Levy.** 1995. Characterisation of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:3414-3419.
336. **Seoane, A. S., and S. B. Levy.** 1995. Identification of new genes regulated by the *marRAB* operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:530-535.
337. **Shea, K.M.** 2005. Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? *Pediatrics* **112**(1):253-258.
338. **Shea, M. E., and H. Hiasa.** 1999. Interactions between DNA helicases and frozen topoisomerase IV-quinolone-DNA ternary complexes. *J. Biol. Chem.* **274**:22747-22754.
339. **Shea, M. E., and H. Hiasa.** 2000. Distinct effects of the UvrD helicase on topoisomerase quinolone-DNA ternary complexes. *J. Biol. Chem.* **275**:14649-14658.
340. **Shen, L. L., and D. T. W. Chu.** 1996. Type II DNA topoisomerases as antibacterial agents. *Curr. Pharmaceut. Design.* **2**:195-208.
341. **Shen, L. L., L. A. Mitscher, P. N. O'Donnell, T. J. Chu, D. T. W. Cooper, C. S. Rosen, and A. G. Pernet.** 1989. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* **28**:3886-3894.
342. **Shuman, S.** 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using Vaccinia DNA topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**:32678-32684.
343. **Sindelar, G., X. Zhao, A. Liew, Y. Dong, J. Zhou, J. Domagala, and K. Drlica.** 2000. Mutant preventing concentration as a measure of fluoroquinolone potency against mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3337-3343.
344. **Slilaty, S. N., and J. W. Little.** 1987. Lysin-156 and serin-119 are required for LexA repressor cleavage: a possible mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:3987-3991.

345. **Slilaty, S. N., J. A. Rupley, and J. W. Little.** 1986. Intramolecular cleavage of LexA and phage lambda repressors: dependence of kinetics on repressor concentration, pH, temperature, and solvent. *Biochemistry* **25**:6866-6875.
346. **Smith, J. T.** 1984. Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibiotics. *Pharm. J.* **233**:299-305.
347. **Smith, J. T.** 1986. Wirkungsmechanismus der Chinolone. *Infection* **14**(Suppl. 1):3-15.
348. **Smith, J. T.** 1991. Ofloxacin, a bactericidal antibacterial. *Chemotherapy* **37**(Suppl. 1):2-13.
349. **Smith, J. T., and C. S. Lewin.** 1988. Chemistry and mechanisms of action of the quinolone antibacterials. p. 23-82. *In*: V. T. Andriole (ed.), *The Quinolones*. Academic Press, San Diego.
350. **Sreedharan, S., M. Oram, B. Jensen, L. Peterson, and L. M. Fischer.** 1990. DNA gyrase *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:7260-7262.
351. **Stahlmann, R., and H. Lode.** 1999. Toxicity of quinolones. *Drugs* **58**(Suppl. 2):37-42.
352. **Stegemann, M., U. Heukamp, M. Scheer, and R. Krebber.** 1996. Kinetics of antibacterial activity after administration of enrofloxacin in dogs serum and skin: in vitro susceptibility of field isolates. *Suppl. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* **18**(2):30-34.
353. **Sternglanz, R., S. DiNardo, K. A. Voelkel, Y. Nishimura, Y. Hirota, A. K. Becherer, L. Zumstein, and J. C. Wang.** 1981. Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* DNA topoisomerase I affecting transcription and transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:2747-2751.
354. **Stratton, C.** 2002. Relationship of fluoroquinolone use to resistance emergence: Vanderbilt University Hospital. Satellite Symposium, poster 009. 44th ICAAC. American Society for Microbiology.
355. **Stryer, L.** 1994. Die Erforschung der Gene. S. 121-145. *In*: L. Stryer, *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
356. **Sugino, A., N. P. Higgins, P. O. Brown, C. L. Peebles, and N. R. Cozzarelli.** 1978. Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**:4838-4842.
357. **Sugino, A., C. L. Peebles, K. N. Kreuzer, and N. R. Cozzarelli.** 1977. Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli nalA* gene and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:4767-4771.
358. **Sutherland, R.** 1995. β -Lactams/ β -lactamase inhibitor combinations: development, antibacterial activity and clinical applications. *Infection* **23**:191-200.
359. **Swartz, M. N.** 1989. Committee of human risk assessment of using subtherapeutic antibiotics in animal feeds, Institute of Medicine, Division of Health Promotion and

- Disease Prevention. *In: Human health risks with the subtherapeutic use of penicillin or tetracyclines in animal feed.* National Academy Press, Washington, D.C.
360. **Taddei, F., I. Matic, and M. Radman.** 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:11736-11740.
361. **Takei, M., H. Fukuda, T. Yasue, and M. Hosaka.** 1998. Inhibitory activities of gatifloxacin (AM-115), a newly developed fluoroquinolone, against bacterial and mammalian topoisomerase II. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(10):2678-2681.
362. **Tanaka, M., Y. Onodera, Y. Uchida, and K. Sato.** 1998. Quinolone resistance mutations in the GrlB protein of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:3044-3046.
363. **Tavio, M. M., J. Vila, J. Ruiz, A. M. Martin-Sanchez, and M. T. Jiménez de Anta.** 1999. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**:735-742.
364. **Taylor, A. F., and G. R. Smith.** 1985. Substrate specificity of the DNA unwinding activity of the RecBCD enzyme of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **185**:431-443.
365. **Telander-Muskavitch, K. M., and A. Linn.** 1982. RecBCD-like enzymes: exonuclease V deoxyribonucleases. p. 233-250. *In: Boyer P. D. (ed), The enzymes, vol. 14.* Academic Press, New York.
366. **Thanassi, D. G., L. W. Cheng, and H. Nikaido.** 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:2512-2518.
367. **Tran, J. H., and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(8):5638-5642.
368. **Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(1):118-125.
369. **Trucksis, M., and R. E. Depew.** 1981. Identification and localization of a gene that specifies production of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**(4):2164-2168.
370. **Tse-Dinh, Y. C., H. Qi, and R. Menzel.** 1997. DNA supercoiling and bacterial adaptation: thermotolerance and thermoresistance. *Trends Microbiol.* **5**(8):323-326.
371. **Uemura, T., H. Ohkuru, Y. Adachi, K. Morino, K. Shiozaki, and M. Yanagida.** 1987. DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* **50**:917-925.
372. **Ullspenger, C., A. V. Vologodskii, N. R. Cozzarelli.** 1995. Unlinking of DNA topoisomerases during DNA replication. p. 115-142. *In: D. M. J. Liley and F. Eckstein, Nucleic Acids and Molecular Biology.* Springer Verlag, Berlin.

373. **Ullspenger, C., and N. R. Cozzarelli.** 1996. Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**:31549-31555.
374. **Vancutsem, P. M., J. G. Babish, and W. S. Schwark.** 1990. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet.* **80**:173-186.
375. **van Diemen, P. M., F. Dziva, M. P. Stevens, and T. S. Wallis.** 2005. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H-genes required for intestinal colonization in calves. *Infect. Immun.* **73**(3):1735-1743.
376. **Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, and J. de Anta.** 1996. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:491-493.
377. **Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goni, E. Giralt.** 1994. Association between double mutations in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2477-2479.
378. **Vila, J., J. Ruiz, and M. M. Navia.** 1999. Molecular basis of quinolone resistance acquisition in gram-negative bacteria. *Rec. Res. Develop. Antimicrob. Chemother.* **3**:323-344.
379. **Vila, J., J. Ruiz, F. Sanchez, F. Navarro, B. Mirelis, and J. de Anta.** 1999. Investigation of quinolone resistance development of an *Haemophilus influenzae* strain isolated from a patient with recurrent respiratory infections treated with ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:161-162.
380. **Voet, D.** 1994. Topoisomerasen. S. 826-829. *In*: D. Voet, *Biochemie*. VCH VerlagsGmbH, Weinheim.
381. **Vogel, F., K.-F. Bodmann.** 2004. Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen. *Chemother. J. Jahrg.* **13**(2):46105.
382. **Vogel, P. L., J. Komtebedde, D. C. Hirsh, and P. H. Kass.** 1999. Wound contamination and antimicrobial susceptibility of bacteria cultured during total ear canal ablation and lateral bulla osteotomy in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **214**(11):1641-1643.
383. **Vollmer, A. C., S. Belkin, D. R. Smulski, T. K. Van Dyk, and R. A. LaRossa.** 1997. Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA'::lux*, *uvrA'::lux*, or *alkA'::lux* reporter plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2566-2571.
384. **Von Eiff, C, C. Heilman, R. A. Proctor, C. Woltz, G. Peters, and F. Gotz.** 1997. A site directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J. Bacteriol.* **179**:4706-4712.
385. **Walker, G. C.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**:60-93.

386. **Walker, G. C.** 1996. The SOS response of *Escherichia coli*. p. 1400-1416. In: F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.
387. **Wall, R. J., A. M. Powell, M. J. Paape, D. E. Kerr, D. D Bannermann, V. G. Pursel, K. D. Wells, N. Talbot, and H. W. Hawk.** 2005. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat. Biotechnol.* **23**(4):445-451.
388. **Walsh, C.** 2003. Where will new antibiotics come from? *Nature Rev. Microbiol.* **1**:65-70.
389. **Walton, L., and L. P. Elwell.** 1988. In vitro cleavage-complex assay to monitor antimicrobial potency of quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:1086-1089.
390. **Wang, J. C.** 1971. Interactions between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J. Mol. Biol.* **55**:523-533.
391. **Wang, J. C.** 1974. Interactions between twisted DNAs and enzymes: the effects of superhelical turns. *J. Mol. Biol.* **87**(4):797-816.
392. **Wang, J. C.** 1998. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart. Rev. Biophys.* **31**:107-144.
393. **Wang, J. C.** 1985. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:665-697.
394. **Wang, J. C.** 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:635-692.
395. **Wang, M., J. H. Tran, G. A. Jacoby, Y. Zhang, F. Wang, and D. C. Hooper.** 2003. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2242-2248.
396. **Watanaben, M., M. Inou, and S. Mitsuhashi.** 1989. In vitro activity of amifloxacin against outer membrane mutants of the family *Enterobacteriaceae* and frequency of spontaneous resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1837-1840.
397. **Watt, P. M., and I. D. Hickson.** 1994. Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem. J.* **303**:681-695.
398. **Webster, S. P., J. R. Bottomley, S. T. Ali, O. A Olusanya, A. McBride, A. E. Gill, and A. Lewendon.** 2002. Chorismate synthase as a novel target for antimicrobial chemotherapy. Abstract F2-743. 42th ICAAC. American Society for Microbiology.
399. **Weigel, L. M., G. J. Anderson and F. C. Tenover.** 2002. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**(8):2582-2587.
400. **Wetzstein, H.-G.** Persönliche Auskunft.
401. **Wetzstein, H.-G., W. Karl, W. Hallenbach, T. Himmler, and U. Petersen.** 2000. Residual antibacterial activity of metabolites derived from the veterinary fluoroquinolone enrofloxacin. 100th General Meeting of the American Society for Microbiology 2000, Los Angeles.

402. **Wetzstein, H.-G., and S. Ochtrop.** 2002. Bacterial activity of pradofloxacin at concentrations ranging from minimum bactericidal up to selected mutant prevention concentrations and serum levels. Abstract F-569. 42th ICAAC. American Society for Microbiology.
403. **Wetzstein, H.-G., N. Schmeer, and W. Karl.** 1997. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gleophyllum striatum*: identification of metabolites. Appl. Environ. Microbiol. **63**(11):4272-4281.
404. **Wetzstein, H.-G., M. Stadler, H.-V. Tichy, A. Dalhoff, and W. Karl.** 1999. Degradation of ciprofloxacin by basidiomycetes and identification of metabolites generated by the brown rot fungus *Gleophyllum striatum*. Appl. Environ. Microbiol. **65**(4):1556-1563.
405. **Whoriskey, S. K., M. A. Schofield, and J. H. Miller.** 1991. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants with altered rates of deletion formation. Genetics **127**(1):21-30.
406. **Wiedemann, B., and P. Heisig.** 1999. Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin). Chemother. J. **8. Jahrg.** (3):99-107.
407. **Willmot, C. J., S. E. Critchlow, I. C. Eperon, and A. Maxwell.** 1994. The complex of DNA gyrase and quinolones drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. J. Mol. Biol. **242**:351-363.
408. **Wise, R.** 1984. Norfloxacin – a review of pharmacology and tissue penetration. J. Antimicrob. Chemother. **13**(Suppl. B):59-64.
409. **Wood, E. R., and W. C. Earnshaw.** 1990. Mitotic chromatin condensation in vitro using somatic cell extracts and nuclei with variable levels of endogenous topoisomerase II. J. Cell. Biol. **111**:2839-2850.
410. **Wood, K. V.** 1998. The chemistry of bioluminescent reporter assays. Promega Notes **65**:14-18.
411. **Yague, G., J. E. Morris, X.-S. Pan, K. A. Gould, and L. M. Fisher.** 2002. Cleavage-complex formation by wild-type and quinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* type II topoisomerases mediated by gemifloxacin and other fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother. **46**(2):413-419.
412. **Yanisch-Perron, C., J. Viera, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and puc19 vectors. Gene **33**:103-119.
413. **Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, and S. Nakamura.** 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **35**:1647-1650.
414. **Yoshida, H., M. Bogaki, S. Nakamura, K. Ubukata, and S. Nakamura.** 1990. Nucleotid sequence and characterisation of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. J. Bacteriol. **172**:6942-6949.

415. **Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, M. Yamanaka, and S. Nakamura.** 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1271-1272.
416. **Yoshida, H., T. Kojima, J. L. Yamagishi, S. Nakamura.** 1988. Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genetics.* **211**:1-4.
417. **Zahnärztliche Mitteilung.** 2005. Wundermittel wirkungslos. ZM-online, 15.03.2005.
418. **Zechiedrich, E. L., and N. R. Cozzarelli.** 1995. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **9**(22):2859-2869.
419. **Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, S. Bachellier, R. Schneider, D. Chen, D. M. Lilley, and N. R. Cozzarelli.** 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**:8103-8113.
420. **Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, and N. R. Cozzarelli.** 1997. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**(19):2580-2592.
421. **Zhang, M. Q. and, A. Haemers.** 1991. Quinolone antimicrobial agents: structure-activity relationships. *Pharmazie* **46**(10):687-700.
422. **Zhao, B. Y., R. Pine, J. Domagala, and K. Drlica.** 1999. Fluoroquinolone action against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: effects of a C-8 methoxy group on survival in liquid media and in human macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**(3):661-666.
423. **Zhao, L., N. M. Allanson, S. P. Thomson, J. K. F. Maclean, J. J. Baker, W. U. Primrose, P. D. Tyler, A. E. Gill and A. Lewendon.** 2002. Inhibitors of phosphopanteteine adenylyltransferase. Abstract F2-748. 42th ICAAC. American Society for Microbiology.
424. **Zhao, X., and K. Drlica.** 2001. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin. Infect. Dis.* **33**(Suppl. 3):147-156.
425. **Zhao, X., J.-Y. Wang, C. Xu, Y. Dong, J. Zhou, J. Domagala, and K. Drlica.** 1998. Killing of *Staphylococcus aureus* by C-8-methoxy fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(4):956-958.
426. **Zhao, X. C. Xu, J. Domagala, and K. Drlica.** 1997. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:13991-13996.

7. Anhang

7.1 Densitometrische Gelauswertung zur Bestimmung des CC₁₀-Wertes von Fluorchinolonen in DNA-Cleavage-Assays mit Gyrase

Tabelle 7.1: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Pradofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration Pradofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2386	18,354	0
0,0005	2621	20,162	1,8
0,001	2343	18,023	-0,3
0,0025	2450	18,846	0,5
0,005	3671	28,238	9,9
0,01	3432	26,400	8,0
0,05	5429	41,762	23,4
0,1	9762	75,092	56,7
1	13000	100,000	81,6

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.2: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Enrofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration Enrofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2791	12,023	0
0,001	3082	13,277	1,3
0,005	5055	21,777	9,8
0,01	6896	29,707	17,7
0,05	9198	39,624	27,6
0,1	15416	66,411	54,4
1	19788	85,245	73,2
10	23213	100,000	88,0

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.3: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Marbofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration Marbofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2072	15,216	0
0,001	2528	18,565	3,3
0,005	3449	25,329	10,1
0,01	3354	24,631	9,4
0,05	5081	37,314	22,1
0,1	7956	58,427	43,2
1	13031	95,697	80,5
10	13617	100,000	84,8

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.4: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Danofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration Danofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	3381	15,956	0
0,001	2995	14,134	-1,8
0,005	5587	26,366	10,4
0,01	6713	31,680	15,7
0,05	8488	40,057	24,1
0,1	12930	61,019	45,1
1	20194	95,300	79,3
10	21190	100,000	84,0

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.5: Ermittlung des CC_{10} -Wertes von Orbifloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration Orbifloxacin [$\mu\text{g/ml}$]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	3663	20,824	0
0,001	4334	24,639	3,8
0,005	5398	30,688	9,9
0,01	6342	36,055	15,2
0,05	12649	71,910	51,1
0,1	14167	80,540	59,7
1	16042	91,200	70,4
10	17590	100,000	79,2

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC_{10} -Wert

Tabelle 7.6: Ermittlung des CC_{10} -Wertes von Ciprofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration Ciprofloxacin [$\mu\text{g/ml}$]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	3344	15,557	0
0,0005	3130	14,562	-1,0
0,001	3987	18,549	3,0
0,005	5345	24,866	9,3
0,01	7989	37,167	21,6
0,05	13389	62,289	46,7
0,1	18813	87,523	72,0
1	20756	96,562	81,0
10	21495	100,000	84,4

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC_{10} -Wert

Tabelle 7.7: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Moxifloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration Moxifloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	3588	15,340	0
0,0005	3466	14,818	-0,5
0,001	3249	13,891	-1,4
0,005	2512	10,740	-4,6
0,01	5892	25,190	9,9
0,05	7143	30,539	15,2
0,1	14133	60,423	45,1
1	19144	81,847	66,5
10	23390	100,000	84,7

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.8: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Gemifloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration Gemifloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1902	12,603	0
0,0005	2120	14,047	1,4
0,001	1735	11,496	1,1
0,005	1965	13,020	0,4
0,01	3173	21,024	8,4
0,05	4166	27,604	15,0
0,1	6599	43,725	31,1
1	14496	96,051	83,4
10	15092	100,000	87,4

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.9: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Garenoxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration Garenoxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1191	11,424	0
0,0005	1092	10,475	-0,9
0,001	1305	12518	1,1
0,005	1750	16,787	5,4
0,01	2242	21,506	10,1
0,05	3239	31,070	19,6
0,1	6053	58,062	46,6
1	9943	95,376	84,0
10	10425	100,000	88,6

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.10: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von BayY3118 im DNA-Cleavage-Assay mit Gyrase

Konzentration BayY3118 [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1851	12,156	0
0,0005	1588	10,429	-1,7
0,001	2432	15,972	3,8
0,005	3455	22,690	10,5
0,01	4855	31,884	19,7
0,05	6115	40,159	28,0
0,1	9210	60,485	48,3
1	12561	82,492	70,3
10	15227	100,000	87,8

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

7.2 Densitometrische Gelauswertung zur Bestimmung des CC₁₀-Wertes von Fluorchinolonen in DNA-Cleavage-Assays mit Topoisomerase IV

Tabelle 7.11: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Pradofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration Pradofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2948	20,054	0
0,005	3026	20,585	0,5
0,01	3932	26,748	6,7
0,05	4524	30,776	10,7
0,1	5843	39,748	19,7
0,5	11526	78,408	58,4
1	12181	82,864	62,8
5	13324	90,639	70,6
10	14700	100,000	79,9

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.12: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Enrofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration Enrofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2701	20,745	0
0,005	2625	20,161	-0,6
0,01	2860	21,966	1,2
0,05	3881	29,808	9,1
0,1	4939	37,934	17,2
0,5	7417	56,966	36,2
1	8929	68,579	47,8
5	12956	99,508	78,8
10	13020	100,000	79,3

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.13: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Marbofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration Marbofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1676	12,110	0
0,005	2581	18,646	6,5
0,01	2379	17,189	5,1
0,05	3026	21,864	9,8
0,1	4024	29,075	17,0
0,5	6890	49,783	37,7
1	7565	54,660	42,6
5	15879	114,733	102,6
10	13840	100,000	87,9

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.14: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Danofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration Danofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2080	25,964	0
0,005	2265	28,274	2,3
0,01	1963	24,504	-1,5
0,05	2166	27,038	1,1
0,1	2831	35,339	9,4
0,5	3869	48,296	22,3
1	4989	62,277	36,3
5	6844	85,433	59,5
10	8011	100,000	74,0

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.15: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Orbifloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration Orbifloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2028	20,219	0
0,005	2099	20,927	0,7
0,01	2551	25,434	5,2
0,05	3285	32,752	12,5
0,1	4004	39,920	19,7
0,5	7184	71,625	51,4
1	7907	78,834	58,6
5	8977	89,501	69,3
10	10030	100,000	79,8

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.16: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Ciprofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration Ciprofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2509	21,548	0
0,005	3272	28,100	6,6
0,01	3085	26,494	4,9
0,05	3200	27,482	5,9
0,1	3965	34,052	12,5
0,5	5350	45,946	24,4
1	10160	87,255	65,7
5	12421	106,673	85,1
10	11644	100,000	78,5

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.17: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Moxifloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration Moxifloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1942	17,481	0
0,005	2106	18,958	1,5
0,01	1995	17,958	0,5
0,05	2974	26,771	9,3
0,1	3894	35,053	17,6
0,5	5943	53,497	36,0
1	7133	64,209	46,7
5	8664	77,991	60,5
10	11109	100,000	82,5

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.18: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Gemifloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration Gemifloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1657	24,588	0
0,005	2072	30,746	6,2
0,01	2474	36,712	12,1
0,05	3405	50,527	25,9
0,1	3690	54,756	30,2
0,5	5754	85,384	60,8
1	6213	92,195	67,6
5	7382	109,541	85,0
10	6739	100,000	75,4

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.19: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Garenoxacin im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration Garenoxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2198	24,644	0
0,005	2679	30,037	5,4
0,01	3278	36,753	12,1
0,05	4553	51,048	26,4
0,1	7054	79,090	54,4
0,5	8466	94,921	70,3
1	8611	96,547	71,9
5	6458	72,407	47,8
10	8919	100,000	75,4

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.20: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von BayY3118 im DNA-Cleavage-Assay mit Topoisomerase IV

Konzentration BayY3118 [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1341	10,956	0
0,005	1868	15,261	4,3
0,01	2171	17,737	6,8
0,05	2888	23,595	12,6
0,1	4071	33,260	22,3
0,5	10320	84,314	73,4
1	10931	89,306	78,4
5	10666	87,141	76,2
10	12240	100,000	89,0

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

7.3 Densitometrische Gelauswertung zur Bestimmung des CC₁₀-Wertes von Fluorchinolonen in DNA-Cleavage-Assays mit humaner Topoisomerase II

Tabelle 7.21: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Pradofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration Pradofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1204	7,838	0
1	1408	9,165	1,3
2	2191	14,262	6,4
4	3135	20,407	12,6
6	6206	40,398	32,6
8	10868	70,746	62,9
10	15362	100,000	92,2

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.22: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Enrofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration Enrofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	878	4,542	0
2	1324	6,850	2,3
6	2897	14,988	10,4
10	5304	27,441	22,9
25	11630	60,169	55,6
50	13203	68,307	63,8
75	21564	111,563	107,0
100	19329	100,000	95,5

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.23: Ermittlung des CC_{10} -Wertes von Marbofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration Marbofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	890	4,540	0
2	1265	6,453	1,9
6	1986	10,131	5,6
10	2556	13,039	8,5
25	5975	30,480	25,9
50	8078	41,208	36,7
75	7013	35,775	31,2
100	4358	22,231	17,7
150	19603	100,000	95,5

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC_{10} -Wert

Tabelle 7.24: Ermittlung des CC_{10} -Wertes von Danofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration Danofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	871	10,147	0
2	970	11,300	1,2
6	913	10,636	0,5
10	1434	16,705	6,6
25	1973	22,985	12,8
50	4379	51,014	40,9
75	7921	92,276	82,1
100	10907	127,062	116,9
150	8584	100,000	89,9

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC_{10} -Wert

Tabelle 7.25: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Orbifloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration Orbifloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	322	2,812	0
2	310	2,708	-0,1
6	828	7,232	4,4
10	516	4,507	1,7
25	1601	13,984	11,2
50	14655	128,002	125,2
75	7227	63,123	60,3
100	10462	91,379	88,6
150	11449	100,000	97,2

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.26: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Ciprofloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration Ciprofloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1662	6,844	0
1	2473	10,183	3,3
2	2220	9,141	2,3
6	2642	10,879	4,0
10	4822	19,856	13,0
25	7801	32,123	25,3
50	18373	75,656	68,8
75	21077	86,790	79,9
100	24285	100,000	93,2

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.27: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Moxifloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration Moxifloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	1140	6,353	0
1	1602	8,928	2,6
2	1742	9,709	3,4
6	3332	18,570	12,2
10	5467	30,469	24,1
25	6499	36,220	29,9
50	4523	25,208	18,9
75	18043	100,557	94,2
100	17943	100,000	93,2

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.28: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Gemifloxacin im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration Gemifloxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	8962	21,975	0
0,05	9091	22,292	0,3
0,1	10585	25,955	4,0
0,5	11008	26,992	5,0
1	12436	30,494	8,5
2	20417	50,064	28,1
6	31098	76,254	54,3
10	40782	100,000	78,0

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.29: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von Garenoxacin im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration Garenoxacin [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2089	12,673	0
1	3058	18,551	5,9
2	4215	25,570	12,9
6	8949	54,289	41,6
10	13049	79,162	66,5
25	14493	87,922	75,2
50	15421	93,551	80,9
75	16219	98,392	85,7
100	16484	100,000	87,3

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

Tabelle 7.30: Ermittlung des CC₁₀-Wertes von BayY3118 im DNA-Cleavage-Assay mit humaner Topoisomerase II

Konzentration BayY3118 [µg/ml]	Bandenintensität* [Volumeneinheiten]	Bandenintensität [%]	Zunahme des Cleavage-Produktes [%]
0	2285	17,565	0
1	2697	20,732	3,2
2	2845	21,869	4,3
6	3940	30,287	12,7
10	3266	25,106	7,5
25	11725	90,130	72,6
50	8872	68,199	50,6
75	3725	28,634	11,1
100	13009	100,000	82,4

* Bezogen auf die lineare Bande (Cleavage-Bande), hervorgehobene Konzentration = CC₁₀-Wert

8. Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Calziumchlorid
CCLR	Cell Culture Lysis Reagent
CDTA	trans-1,2-Diaminocyclohexan, N,N,N',N',Tetraacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside
KBE	Koloniebildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K ₂ HPO ₄	di-Kalium-hydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgOAc	Magnesiumoxalacetat
min	Minute
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
MSIC	minimale SOS induzierende Konzentration
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	di-Natrium-hydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid

nm	Nanometer
OBC	optimale bakterizide Konzentration
OD	optische Dichte
p.A.	zu Analyse
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Pikomol
RnaseA	Ribonuklease A
RLU	Relative Light Units
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
U	Unit
ÜNK	Übernachtkultur
upm	Umdrehungen in der Minute
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
V	Volt

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Heisig für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Insbesondere danke ich ihm für seine stete Motivation, Diskussions- und Hilfsbereitschaft, die meine Arbeit sehr gefördert und positiv beeinflusst haben, sowie für die Gelegenheit an verschiedenen Kongressen teilnehmen zu können.

Herrn Prof. Dr. Bernd Wiedemann danke ich sehr für die Möglichkeit den ersten Teil dieser Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Allen Mitgliedern der Arbeitskreise Heisig und Wiedemann danke ich für das angenehme Arbeitsklima, das durch stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie Humor geprägt wurde.

Frau Dr. Anke Heisig möchte ich besonders für die Durchführung der Sequenzierungen danken.

Mobarak Abu Mraheil und Tom Grüger danke ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Tatjana Clausen und Elisabeth Luhmer danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der MHK-Bestimmungen und zahlreicher Absterbekinetiken.

Antje Schnasse, Antje Preisler, Heike Hansen-Petry und Inge Luhmer-Becker danke ich für ihre Freundschaft, die vielen gemeinsamen Laborstunden, die helfende Hand, wenn Not an der Frau war, sowie das sportliche und gesellige Rahmenprogramm.

Herzlich danke ich auch Sabine Badziong für ihre stets freundliche und geduldige Hilfe bei außerlaboratorischen „Kleinigkeiten“.

Der Firma Bayer HealthCare danke ich für die finanzielle Unterstützung. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. Heinz-Georg Wetzstein für die Bereitstellung von Pradofloxacin und dem dazugehörigen Informationsmaterial, sowie für die freundliche Begleitung der Arbeit.

Ein liebevoller Dank gilt meinem Mann Ralf für das Korrekturlesen der Arbeit, seine Unterstützung in guten und schlechten Tagen und nicht zuletzt für die Tausenden von Kilometern, die er für mich zurückgelegt hat.

Ein besonders lieber Dank gilt meinen Eltern für ihren fortwährenden Zuspruch, ihr offenes Ohr und das Zusammenstehen in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Name: Barbara Körber-Irrgang
geboren: 27.11.1970 in Bonn

Schulbildung:

1977 – 1981 Grundschole, Heimerzheim
1981 – 1987 Realschole Medinghoven, Bonn-Duisdorf
1987 – 1990 Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium, Bonn

Ausbildung:

1990 – 1992 MTA-Schole, Bonn-Venusberg

Akademischer Werdegang:

1992 – 1998 Studium der Biologie mit Schwerpunkt Mikrobiologie, Genetik und Biochemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn

1998 – 1999 Institut für Med. Mikrobiologie und Immunologie, Bonn

1999 – 2000 Merlin Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostika, Bornheim-Hersel

seit 2000 Wiss. Mitarbeiterin am Institut für Med. Mikrobiologie und Immunologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn und am Institut für Pharmazie an der Universität Hamburg
Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig, gefördert von Bayer HealthCare

Poster und Veröffentlichungen:

Körber, B., E. Luhmer, H. Linde, N. Lehn, and P. Heisig. 2001. Bactericidal mechanisms of moxifloxacin against defined topoisomerase mutants of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. 7th International Symposium on New Quinolones. Edinburgh, UK.

Körber, B., E. Luhmer, H. Linde, N. Lehn, , and P. Heisig. 2001. Bactericidal mechanisms of moxifloxacin against defined topoisomerase mutants of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. P18. J. Antimicrob. Chemother. 47(Suppl. S1):21.

Körber, B., E. Luhmer, H.-G. Wetzstein, and P. Heisig. 2002. Bactericidal mechanisms of pradofloxacin, a novel 8-cyanofluoroquinolone. 42nd ICAAC. American Society for Microbiology, San Diego, CA.

Körber, B., and P. Heisig. 2003. Inhibition of pro- and eukaryotic topoisomerase II DNA-cleavage mediated by moxifloxacin. 10th ESC. Vienna, Austria.

Körber, B., and P. Heisig. 2003. Inhibition of pro- and eukaryotic topoisomerase II DNA-cleavage mediated by moxifloxacin. P76. Antibiotika Monitor 19. Jahrg.(3/4):56.

Körber-Irrgang, B., H.-G. Wetzstein, and P. Heisig. 2004. SOS response induction as a highly sensitive indicator for the bactericidal potency of pradofloxacin. 44nd ICAAC. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Auszeichnung:

JT Smith Research Award, 2001, 7th International Symposium on New Quinolones. Edinburgh, UK.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Arbeiten entnommen sind, habe ich unter genauer Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Hamburg, den 15.09.2005

.....

Barbara Körber-Irrgang