

**Entwicklung eines molekularbiologischen Testsystems
zum Nachweis von Inhibitoren bakterieller
Topoisomerasen, deren Wirkung und des DNA-
Superspiralisierungsgrades *in vivo***

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Mobarak Abu Mraheil
aus Gaza

2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Februar 2004 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Heisig am Institut für medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Abteilung pharmazeutische Mikrobiologie der Universität Bonn und am Institut für Pharmazie, Abteilung pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie der Universität Hamburg angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Joachim Thiem

Gutachter: 1- Prof. Dr. Peter Heisig
2- Prof. Dr. Bernward Bisping

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2005

Für meine Eltern, meine Frau und Yasser

1	Einleitung.....	1
1.1	Antibiotika und das Problem der Resistenzentwicklung.....	1
1.2	Strategien zur Entwicklung neuer Antibiotika:.....	2
1.3	DNA Topologie	3
1.3.1	Histonähnliche Strukturproteine.....	5
1.3.2	DNA Topoisomerasen	6
1.3.2.1	Topoisomerase I.....	7
1.3.2.2	Gyrase.....	7
1.3.2.3	Topoisomerase III.....	8
1.3.2.4	Topoisomerase IV.....	11
1.4	Regulation der DNA Superspiralisierung	11
1.5	Hemmstoffe der Topoisomerasen.....	12
1.6	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Bakterienstämme.....	15
2.1.2	Vektoren	16
2.1.3	Oligonukleotide.....	17
2.1.4	Nährmedien	18
2.1.5	Enzyme.....	19
2.1.6	Chemotherapeutika	19
2.1.7	Getestete Reinsubstanzen	20
2.1.8	Chemikalien.....	20
2.1.9	Puffer und Lösungen	21
2.1.10	Geräte und Material.....	22
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Herstellung von Dauerkulturen	23
2.2.1.1	Glycerindauerkulturen.....	23
2.2.1.2	Stichkulturen.....	23
2.2.2	Bestimmung der Keimzahl.....	24
2.2.3	Bestimmung der MHK.....	24
2.2.4	Bestimmung der MBK.....	25
2.2.5	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide	25
2.2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	25
2.2.7	PCR-Fusions-Technick (SOEing)	27
2.2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	29
2.2.9	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA	30
2.2.9.1	Extraktion von DNA Banden aus Agarosegelen	30
2.2.9.2	Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen.....	31
2.2.9.3	Reinigung und Konzentrierung von DNA durch Ethanol-fällung	31
2.2.10	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	31
2.2.11	Enzymatische Modifikation von DNA	32
2.2.11.1	Restriktionsverdau	32
2.2.11.2	Ligation	32
2.2.12	Präparationen von Plasmiden.....	34
2.2.12.1	Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lysis.....	34
2.2.12.2	Plasmid-Minipräparation mittels Silikagel-Säulen	34
2.2.12.3	Plasmid-Minipräparation modifiziert nach BIRNBOIM und DOILY.....	35

2.2.12.4	Plasmid-Midipräparation	35
2.2.13	Herstellung Kompetenter Bakterien und Transformation	36
2.2.13.1	Herstellung kompetenter Bakterien nach der CaCl ₂ -Methode	36
2.2.13.2	Transformation nach der Methode von HANAHAN.....	37
2.2.13.3	Herstellung elektrokompeter Zellen	37
2.2.13.4	Elektroporation.....	38
2.2.14	Konjugation.....	38
2.2.15	Sequenzierung.....	39
2.2.16	Bestimmung der spezifischen Luciferase-Aktivität.....	40
2.2.16.1	Ansatz in Reagenzglasröhrchen	40
2.2.16.2	Ansatz in Mikrotiterplattenformat	41
2.2.17	Berechnung des Qsc-Werts.....	41
2.2.18	Wirkung von Reinsubstanzen und Extrakten auf den Qsc.....	42
2.2.19	Nachweis der lebenden Bakterienzellen mittels MTT-Reagenz.....	42
2.2.20	Anzüchten des Novobiocin-Produzenten <i>Streptomyces caeruleus</i>	43
2.2.21	Herstellung der zu testenden Extrakte.....	43
2.2.22	Agardiffusionstest auf Agarplatten	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Klonierung eines funktionsfähigen <i>luc</i> -Reportergenkonstrukts in das Vektorplasmid pBR322	45
3.2	Charakterisierung der Reportergenplasmide	47
3.3	Optimierung der Messbedingungen mit dem Reportergensystem	48
3.3.1	Bedingungen zur Messung der „relative light units“ (RLU)	48
3.3.2	Linearität des Messbereichs	49
3.3.3	Ermittlung der spezifischen Luciferase-Aktivität	50
3.3.4	Stabilität des Lichtsignals	51
3.4	Spezifität und Validität des Reportergensystems.....	52
3.4.1	Auswirkung von Mutationen in <i>gyrA</i> und <i>topA</i> auf die Superspiralisierung	52
3.4.2	Einfluss von bekannten Gyrase-Inhibitoren auf den Qsc-Wert	54
3.4.2.1	GyrA-Inhibitoren.....	54
3.4.2.2	GyrB-Inhibitoren.....	56
3.4.2.3	Einfluss von Gyrase Inhibitoren auf die Mutante WT-3-1 (<i>gyrA</i> ^{S83L,D87G}) ...	56
3.4.3	Effekt von Ampicillin (Negativkontrolle).....	57
3.4.5	Einfluss variierender Inkubationsbedingungen auf den Qsc	58
3.4.5.2	Osmolarität	59
3.4.5.3	Wachstumsphase	59
3.5	Einfluss von potentiellen Topoisomerase-Inhibitoren.....	60
3.5.1	Simocyclinon	60
3.5.2	Rubradirin	61
3.5.3	Helenalin.....	62
3.6	Einsatz der hyperempfindlichen <i>E. coli</i> Mutante DE112	63
3.7	Konstruktion der Reportergenplasmide pPHB92 und pPHB93	65
3.8	Spezifität und Validität des pACYC177-Reportergensystems	66
3.8.1	Auswirkung von Mutationen in <i>gyrA</i> und <i>topA</i> auf die Superspiralisierung	66
3.8.2	Einfluss von bekannten Gyrase-Inhibitoren auf den Qsc-Wert	67
3.8.2.1	GyrA-Inhibitoren.....	67
3.8.2.2	GyrB-Inhibitoren.....	68
3.9	Effekt von Ampicillin (Negativkontrolle).....	68
3.10	Einsatz des Reportergensystems zum Naturstoffscreening	69

3.10.1	Einfluss von DNA-Interkalatoren (Ethidiumbromid).....	69
3.10.2	Kulturüberstand von <i>Streptomyces caeruleus</i>	70
3.10.3	Herniarin und Xanthotoxin	71
3.10.4	Screening von pflanzlichen Extrakten auf Wirkung gegen Gyrase und Topoisomerase I.....	72
3.10.4.1	Angelikawurzel-Extrakt	72
3.10.4.2	Einfluss von Rautenkraut-Extrakt.....	73
3.10.5	Einfluss von ausgewählten Pilzextrakten.....	74
3.11	Prüfung der Durchführung der Qsc-Bestimmung im Mikrotiterplatten-format für Screeningverfahren mit erhöhtem Probendurchsatz	76
3.12	Erweiterung der Anwendbarkeit des Testsystems	77
3.12.1	Konstruktion der Reporterplasmide pPHB94 und pPHB95.....	78
3.12.2	Spezifität und Validität des Reportergensystems.....	80
3.12.2.1	Auswirkung von Mutationen in <i>gyrA</i> und <i>topA</i> auf die Superspiralisierung	80
3.12.2.2	GyrA-Inhibitoren.....	81
3.12.2.3	GyrB-Inhibitoren.....	81
3.13	Bestimmung von Qsc-Werten verschiedener attenuierter <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> Stämme	82
4	Diskussion.....	84
4.1	Bisher angewandte Methoden zur Bestimmung der Superspiralisierung... 84	84
4.2	Entwicklung des Testsystems.....	86
4.3	Messbedingungen	87
4.4	Charakterisierung der Superspiralisierung.....	88
4.4.1	Einfluss von bekannten <i>gyrA</i> - und <i>topA</i> -Mutationen auf den Qsc-Wert	88
4.4.2	Superspiralisierung nach Hemmung von GyrA.....	91
4.4.3	Superspiralisierung nach Hemmung von GyrB.....	92
4.4.4	Einfluss von Gyrase-Inhibitoren auf die Mutante WT-3-1 (<i>gyrA</i> ^{S83L,D87G}) ...	94
4.4.5	Einfluss variierender Inkubationsbedingungen	95
4.4.5.1	Nährstoffgehalt	95
4.4.5.2	Osmolarität	96
4.4.5.3	Wachstumsphase	96
4.4.6	Bestimmung der Qsc-Werte in Mikrotiterplattenformat	97
4.5	Detektion möglicher Inhibitoren der Topoisomerase I und Gyrase	97
4.5.1	Isolierte Naturstoffe als potentielle Inhibitoren	97
4.5.2	Extrakte	100
5	Zusammenfassung	103
6	Literatur	105
7	Verwendete Abkürzungen	121
	Danksagung	123
	Lebenslauf.....	125

1 Einleitung

1.1 Antibiotika und das Problem der Resistenzentwicklung

Mit der Einführung der Antibiotika Mitte des letzten Jahrhunderts glaubte man bakterielle Infektionen bald besiegt zu haben. Obwohl bereits rasch nach dem Einsatz neuer Antibiotika manche Krankheitserreger eine Resistenz entwickelten, wie z. B. Isolate von *Staphylococcus aureus* durch eine Penicillinase (Penicillin hydrolysierendes Enzym), die im Jahr der Markteinführung von Penicillin, 1940, identifiziert worden war [1], war es durch eine stetige Entwicklung neuer Antibiotika gelungen, dieses Problem eine Zeitlang unter Kontrolle zu halten.

Seit 1962, als mit Nalidixinsäure der erste Vertreter der synthetischen Antibiotikaklasse der Chinolone zugelassen worden war, hat es erst wieder im Jahr 2000 mit dem Oxazolidinon Linezolid eine neue, hoch wirksame Antibiotikaklasse für klinische Anwendungen gegeben. Doch das Problem der raschen Resistenzentwicklung ist sowohl für Nalidixinsäure [36] als auch für Linezolid beschrieben [68, 174].

Von einer solchen erworbenen oder sekundären Resistenz, die nur einzelne Vertreter einer Bakterienspezies betrifft, lässt sich die intrinsische primäre Resistenz unterscheiden. Letztere wird auch als natürliche Resistenz bezeichnet, z. B. sind *Enterobacteriaceae* gegenüber Glycopeptiden natürlich oder intrinsisch resistent, da diese die äußere Membran nicht passieren können. Sekundäre Resistenz wird dagegen durch ein zufälliges, spontanes genetisches Ereignis, wie eine oder mehrere Mutationen oder die Übertragung extrachromosomaler DNA mittels parasexueller Prozesse wie Transformation, Transduktion und Konjugation von einer Zelle auf eine andere der gleichen oder einer anderen Spezies, erworben [31, 32]. Da Bakterienzellen haploid sind, prägt sich eine Resistenzmutation phänotypisch direkt aus.

Bakterielle Resistenz gegenüber Antibiotika beruht auf drei Grundmechanismen [76]

- 1- Veränderung der Zielstruktur
- 2- Verhinderung des Zugangs der Substanz zur Zielstruktur
- 3- Enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums

1.2 Strategien zur Entwicklung neuer Antibiotika:

Da das Problem der bakteriellen Resistenzentwicklung alle heutzutage genutzten Antibiotikaklassen einschließt, gewinnt die Suche nach neuen, klinisch wirksameren Antibiotika immer mehr an Bedeutung. Der kostenintensive, auf durchschnittlich 800 Millionen Dollar Entwicklungskosten geschätzte [40], Prozess der Entwicklung eines antibiotischen Wirkstoffs dauert von der Entdeckung bis zur Anwendung durchschnittlich über 10 Jahre [53]. Um mit der ständigen Resistenzentwicklung Schritt zu halten, werden verschiedene Wege zur Entwicklung neuer Antibiotika eingeschlagen:

i. Chemische bzw. biotechnologische Modifikation bekannter Antibiotika

Die kurzfristige Antwort der Pharmaindustrie auf die rasche Entwicklung bakterieller Resistenz ist die chemische Modifikation vorhandener Antibiotikaleitstrukturen. [13]. Alle in der Zeit zwischen der Einführung von Nalidixinsäure (1962) und Linezolid (2000) auf den Markt gekommenen Antibiotika waren Modifikationen aus bereits bekannten Strukturen [12]. Als Beispiel seien hier die vier Generationen der Fluorchinolone und die verschiedenen β -Laktam-Antibiotika erwähnt, die jeweils eine identische Grundstruktur aufweisen, aber auf Grund verschiedener Substituenten verbesserte Aktivität z.T. auch gegenüber resistenten Mutanten zeigten. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass bei bereits bestehender Resistenz gegen die Ausgangsverbindung häufig eine Kreuzresistenz gegen ihre Derivate besteht.

ii. Identifizierung neuer Angriffsziele in Bakterien

Die Identifizierung neuer Zielstrukturen vor allem durch neue Methoden, wie z. B. Genomics, stellt den ersten Schritt einer neuartigen Strategie dar, deren Nachteil jedoch die zeitintensive und z.T. aufwendige Grundlagenforschung ist. Keines der derzeit in klinischer Prüfung befindlichen oder in den letzten Jahren eingeführten Antibiotika wurde bislang mit Hilfe dieser Strategie entdeckt [13]. Darüber hinaus ist bei erfolgreicher Targetidentifizierung ein zweiter Schritt zur Identifizierung neuer Leitstrukturen notwendig, um daraus klinisch einsetzbare toxikologisch verträgliche Antibiotika zu entwickeln. Einige vielversprechende Vertreter sind allerdings inzwischen in die vorklinische Entwicklung gelangt, wie Inhibitoren der bakteriellen Peptid-Deformylase (PDF) [4, 51].

iii. Die Suche nach neuen Antibiotika mit Wirkung auf eine bekannte Zielstruktur

Diese Methode bietet den Vorteil, dass für die Identifizierung strukturell neuer Substanzklassen bereits grundlegende Kenntnisse für die Entwicklung biologischer Testsysteme auf potentielle Inhibitoren vorliegen. Auch liegen prinzipielle Erkenntnisse zu möglichen toxikologischen Problemen bei der Auswahl eines bekannten Targets vor.

Ein sehr gutes Beispiel für eine solche Zielstruktur stellt DNA-Gyrase dar. DNA-Gyrase ist die bakterielle Topoisomerase II, die mit Topoisomerase IV zu den Typ-II-Topoisomerasen gezählt wird. Zusammen mit den beiden Typ-I-Topoisomerasen, Topoisomerase I und Topoisomerase III, kontrollieren sie die DNA-Topologie (dreidimensionale Struktur) in *Escherichia coli* (*E. coli*) sowie in fast allen, bislang untersuchten Eubakterien.

1.3 DNA Topologie

Das Chromosom einer Bakterienzelle (*E. coli*) ist ein zirkuläres, kovalent geschlossenes, doppelsträngiges DNA-Molekül. Mit ca. 4×10^6 Basenpaaren (bp) hat es als ausgestreckter Faden eine Länge von rund 1,7 mm und ist damit etwa 850mal länger als eine durchschnittliche *E. coli* Zelle. Um dieses Molekül in der Zelle unterzubringen, muss es in der Zelle extrem kondensiert werden. Dafür ist ein hohes Maß an struktureller Organisation erforderlich, da der Faltungsmechanismus nicht nur für eine enge Verpackung sorgen, sondern auch einer Vielzahl von Enzymen den Zugang zu den darin enthaltenen Informationen ermöglichen muss.

In der physiologischen B-Konformation sind die beiden Einzelstränge der DNA entlang der Helixachse alle 10,5 bp einmal umeinander gewunden und pro Windung auch einmal miteinander verknüpft. Topologisch befindet sich ein DNA Molekül im relaxierten Zustand, wenn die Zahl der Umwindungen mit der Zahl der Verknüpfungen übereinstimmt; die Helixachse liegt dann in einer Ebene. Dieser relaxierte Zustand kann durch Veränderung der Zahl der Verknüpfungen der beiden DNA Stränge miteinander in einen superspiralisierten Zustand überführt werden. Wird die Zahl der Verknüpfungen verringert, so spricht man von negativer Superspiralisierung. Eine positive Superspiralisierung entsteht durch Erhöhung der Zahl der Verknüpfungen.

Die Folge der Entfernung einer Verknüpfung aus einem DNA Molekül ist zunächst formal die Verringerung der Zahl der Basenpaare je Windung. Dies stellt jedoch eine Abweichung von der durch Basenpaarungen stabilisierten B-Konformation der DNA dar (die Form mit 10,5 bp je Windung). Diese Abweichung führt dazu, dass das Molekül unter Torsionsspannung steht. Diese wird in der Regel dadurch kompensiert, dass die Achse der DNA sich zu einer Superspirale aus der Ebene herauswindet (Abbildung 1-1). Unter Superspiralisierung versteht man also die Spiralisierung einer Spirale.

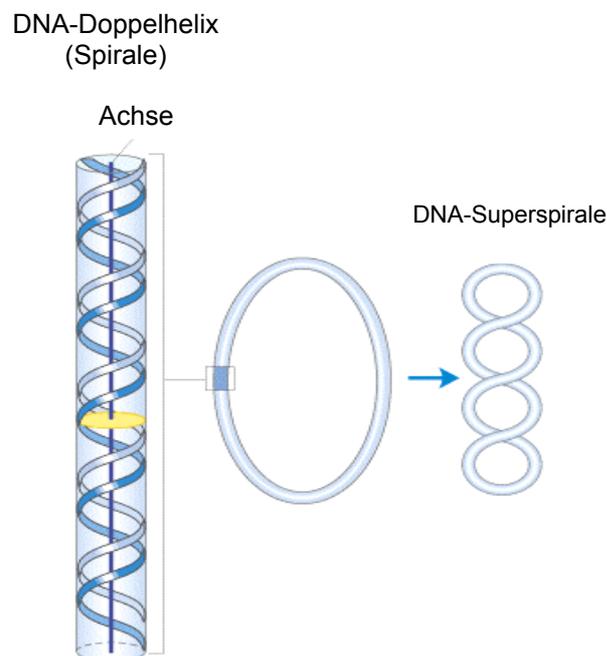


Abbildung 1-1: (modifiziert nach Lehninger [107])

Superspiralisierung von DNA: Wenn die Achse der DNA-Doppelhelix eine Spirale bildet, entsteht eine neue Helix (Superspirale)

Dieser Zustand lässt sich nur dann aufrechterhalten, wenn die DNA ein geschlossener Ring ist, oder wenn sie durch Proteine so gebunden und stabilisiert wird, dass die Stränge nicht frei umeinander rotieren können. Ein Strangbruch führt an der Bruchstelle zu freier Rotation, so dass eine aufgewundene DNA spontan in den relaxierten Zustand übergeht.

Die Superspiralisierung der DNA hat neben der Komprimierung des Chromosoms, wichtige Bedeutung für mehrere Prozesse in der Zelle. Die in der negativ superspiralisierten DNA konservierte Energie in Form von Torsionsspannung und die darin bereits vorliegende Unterwindung erleichtern Prozesse wie DNA-Replikation,

Transkription und Rekombination, die eine lokale Trennung der beiden komplementären Stränge der DNA erfordern. Dabei muss auch berücksichtigt werden, dass solche Prozesse die Superspiralisierung selbst lokal verändern können: So haben Experimente *in vivo* und *in vitro* gezeigt, dass z.B. bei der Transkription eine von Helicase katalysierte Aufschmelzung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen lokal die Entstehung positiver Superspiralisierung vor dem Replikationskomplex bewirkt [21, 49, 178], während dahinter negative Superspiralisierung entsteht [30, 110, 142, 143, 169, 190].

Neben den oben genannten intrazellulären Prozessen, die den Superspiralisierungszustand der DNA verändern, bewirken dieses auch externe Faktoren. So haben mehrere Studien *in vivo* einen deutlichen Einfluss von Umweltbedingungen, wie Temperatur, Nährstoffgehalt, Osmolarität sowie Sauerstoffgehalt gezeigt [8, 43, 67, 93, 94]. Außerdem hat die Wachstumsphase der Bakterienzellen einen Einfluss auf die Superspiralisierung [148, 173].

Der DNA Superspiralisierungsgrad ist weiterhin als ein globaler Regulator der Expression vieler Gene zu betrachten: einerseits kann dadurch die räumliche Position der -10- und -35-Promotorregionen so verändert werden, dass eine topologisch günstigere Anordnung erreicht wird, die eine effizientere Bindung von RNA-Polymerase ermöglicht. Andererseits kann aber auch der gegenteilige Effekt hervorgerufen werden, was zu einer Herabregulation des über den entsprechenden Promotor regulierten Gens führt [42, 84, 129].

Somit ist verständlich, dass es für die Bakterienzelle essentiell ist, die DNA-Superspiralisierung innerhalb eines bestimmten Bereichs aufrecht zu erhalten. Zur Gewährleistung dieses Zustandes übernehmen Proteine eine lebenswichtige Rolle, um den sich ständig ändernden topologischen Zustand des bakteriellen Chromosoms innerhalb enger Grenzen auf einem konstanten Niveau zu halten. Zu diesen Proteinen gehören einerseits histonähnliche Strukturproteine und andererseits enzymatisch wirkende Topoisomerasen.

1.3.1 Histonähnliche Strukturproteine

Neben den Topoisomerasen sind an der Kondensierung und Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur der DNA kleine basische oder neutrale Proteine beteiligt, die in ihrer Funktion mit den Histonen in den Nukleosomen vergleichbar sind, also als

Strukturproteine wirken. Aufgrund dieser Ähnlichkeit werden sie als „histonähnliche Proteine“ bezeichnet. Um sie jedoch von den Histonen der Eukaryonten abzugrenzen, werden sie häufig auch Nukleotid-assoziierte Proteine genannt [48, 73, 136]. Mengenmäßig dominieren die Proteine HU, IHF (Integration Host Faktor) und H-NS (Histon-like Nukleotid Structuring protein). Sie sind in der Lage die DNA zu biegen oder aufzuwickeln und binden präferiert und mit höherer Affinität gebogene DNA. Sie biegen die Helixachse des DNA Doppelstrangs und erhöhen die Flexibilität in kurzen DNA-Abschnitten. Es wird angenommen, dass ohne die DNA-Bindeproteine die superhelikale Dichte nur halb so groß wäre [135, 18].

1.3.2 DNA Topoisomerasen

DNA Topoisomerasen sind Enzyme, welche eine enzymatische Kontrolle über die DNA Superspiralisierung in den Bakterienzellen ausüben und diese innerhalb bestimmter Grenzen halten, was für die Bakterienzellen von essentieller Bedeutung ist. Außerdem werden die Aktivitäten von Topoisomerasen selbst sowie die Expression ihrer Gene durch Superspiralisierung reguliert [116, 132, 171, 191]. Diese Regulation ist unter Punkt 1.4 erläutert.

Topoisomerasen wurden außer bei Prokaryoten und Eukaryoten auch bei Archaea sowie bei Viren und Bakteriophagen nachgewiesen [26]. Sie werden je nach Reaktionsmechanismus in zwei Kategorien unterteilt: Typ I oder Typ II. Die Typ I Topoisomerasen katalysieren einen Einzelstrangbruch, während die Typ II Topoisomerasen unter ATP-Verbrauch einen Doppelstrangbruch in die DNA einführen [65, 177]. Je nachdem, an welcher Position der Desoxyribose sich die Phosphatgruppe befindet, mit der die Typ I Topoisomerasen vorübergehend verbunden werden, unterscheidet man zwischen Typ IA (bindet an 5' Phosphat) und Typ IB (bindet an 3' Phosphat). Alle Typ II Topoisomerasen der eukaryotischen und prokaryotischen Zellen werden dem Typ IIA zugeordnet. Eine Ausnahme stellt die Typ II Topoisomerase von *Sulfolobus shibatae* dar, die Topoisomerase VI genannt und dem Typ IIB zugeordnet wird [15, 23, 26].

In *E. coli* wurden vier Topoisomerasen identifiziert: Topoisomerase I, II, III und IV. Davon werden die Topoisomerasen I und III dem Typ IA und die Topoisomerasen II und IV dem Typ IIA zugeteilt.

1.3.2.1 Topoisomerase I

Die Topoisomerase I wird durch das *topA*-Gen codiert. Sie ist ein Monomer und gehört zu den Typ IA-Topoisomerasen [172, 176]. Hauptfunktion der Topoisomerase I ist die Relaxierung der während der Transkription entstehenden erhöhten negativen Superspiralisierung [113]. Die Bindung der Topoisomerase I an die doppelsträngige (ds) DNA führt zur lokalen Trennung der beiden Fragmente. Anschließend spaltet sie einen Strang und der zweite intakte Strang der DNA-Doppelhelix rotiert durch die entstandene Lücke um den anderen Strang [102, 176, 178]. Ein schematisches Modell, das „enzyme-bridging model“ [22, 25], zur Erklärung des Relaxierungsmechanismus durch die Topoisomerase I ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

Da die Aktivität von Topoisomerase I essentiell für die Zelle ist, sind Deletionsmutanten von *topA* in *E. coli* nur lebensfähig, wenn kompensatorische Mutationen vorliegen. Einige dieser kompensatorischen Mutationen führen zur Reduktion der Gyraseaktivität [74], so dass der zunächst erhöhte negative Superspiralisierungsgrad in diesen Mutanten an das Niveau des Wildtyps angenähert wird. Solche *E. coli topA*-Mutanten weisen einen erhöhten Superspiralisierungsgrad auf [41, 44, 141, 145, 149, 161, 162].

1.3.2.2 Gyrase

Die bakterielle Topoisomerase II wird Gyrase genannt. Sie ist das einzige bekannte Enzym, das negative Superspiralen in die DNA einführen kann. Sie ist ein Heterotetramer, das aus jeweils 2 Untereinheiten A und B besteht (A_2B_2), die durch *gyrA* (A-Untereinheit) und *gyrB* (B-Untereinheit) codiert werden [62, 146]. Die Gyrase gehört in die Gruppe der Typ IIA-Topoisomerasen und reduziert die Verwindungszahl des DNA-Moleküls um 2 durch die vorübergehende Einführung eines DNA-Doppelstrangbruchs unter ATP-Verbrauch. Die durch Gyrase katalysierte Reaktion ist in Abbildung 1-3 anhand der homologen Topoisomerase II aus *Saccharomyces cerevisiae* erläutert [14]. Zunächst wird ein 140 bp Fragment (G-Segment) in Form einer Schleife um das Enzym gewunden. Nach Bindung von ATP wird ein um 4 bp versetzter Doppelstrangbruch eingeführt [131, 179]. Die dabei frei gewordenen 5'-Phosphatgruppen werden kovalent an je einen Tyrosinrest (Tyr-122) der A-Untereinheit gebunden [92]. Die Fixierung der freien 3'-OH-Gruppen erfolgt

vermutlich über nicht kovalente Bindung an das Enzym. Ein anderer Bereich desselben DNA-Moleküls (T-Segment, Abb. 1-3) wird durch die Lücke des DNA-Doppelstrangbruches geführt und der Doppelstrangbruch anschließend unter Wiederherstellung der Phosphodiesterbindung durch Religation geschlossen [146, 150]. Durch nachfolgende ATP-Hydrolyse kehrt die Gyrase in ihre Ausgangsformation zurück. Damit wird ein Reaktionszyklus abgeschlossen, der die Verwindungszahl, oder Anzahl der Verknüpfungen, in einem DNA-Molekül um 2 verringert hat. In Abwesenheit von ATP relaxiert Gyrase die DNA und verringert damit die Anzahl negativer Superspiralen [64, 163].

1.3.2.3 Topoisomerase III

Die durch *topB* codierte Topoisomerase III (Typ IA) ist ein Monomer und verwendet hypernegativ superspiralisierte DNA als Substrat [38]. In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass Topoisomerase III das Voranschreiten der Replikationsgabel erleichtert, obwohl sie nicht in der Lage ist, positiv superspiralisierte DNA zu relaxieren [81]. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist, dass Topoisomerase III einen Beitrag bei der Trennung der Precatenane, Vorstufen von verknüpften Chromosomen, hinter der Replikationsmaschinerie leistet [38, 38, 81, 160].

Die Topoisomerase III ist das einzige nicht essentielle Enzym unter den vier Topoisomerasen [157, 181]. So sind *E. coli topB*-Mutanten lebensfähig und benötigen keine kompensatorische Mutationen [39]. Dennoch sind Stämme, in denen *topB* deletiert ist, durch einen von RecA unabhängigen „Hyperrecombination-Phenotype“ charakterisiert [157].

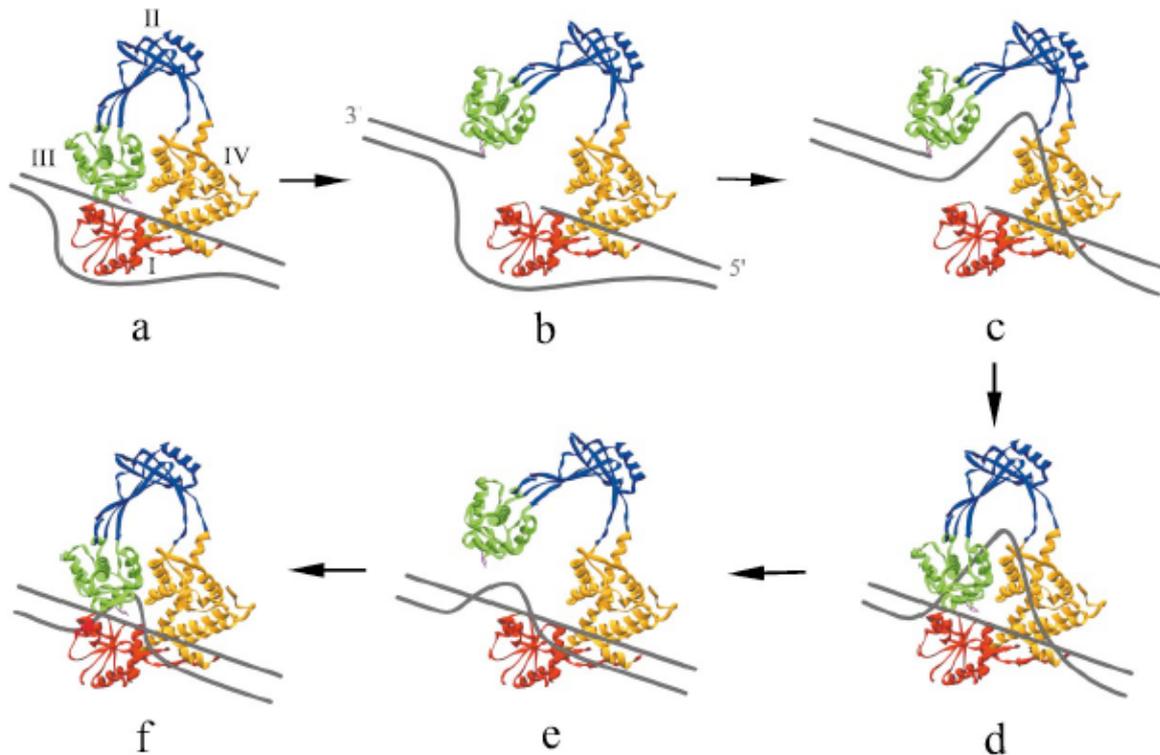


Abbildung 1-2: Schematisches Modell für die Schritte der Relaxierung der DNA in *E. coli* durch Topoisomerase I (modifiziert nach Champoux 2001[26]):

a- Ein DNA-Einzelstrang bindet an die Domäne III (grün) der Topoisomerase I.

b- Dadurch erfährt die Domäne III eine Konformationsänderung und der DNA-Einzelstrang wird gespalten. Das 5'-Ende des gespaltenen Strangs bindet kovalent an einen Tyrosinrest an Position 319 der Domäne III. Das 3'-Ende wird durch eine nicht kovalente Bindung vermutlich an der Domäne I (rot) festgehalten [54, 109]. Direkt nach der Spaltung des DNA-Strangs bewegt sich die Dömäne III mit dem gebundenen 5'-Ende weg von der Domäne I. Dadurch entsteht eine Lücke („gate“).

c- Der intakte DNA Strang passiert diese Lücke.

d- Sobald die Passage des intakten Strangs abgeschlossen ist, bekommt das Protein seine ursprüngliche Struktur und der gesplattene Strang wird religiert.

e- Die Domänen I und III müssen sich noch einmal trennen (wie in b), um den intakten Strang wieder loszulassen.

f- Die Topoisomerase I nimmt ihre Ausgangskonformation wieder ein und kann einen zweiten Reaktionszyklus starten.

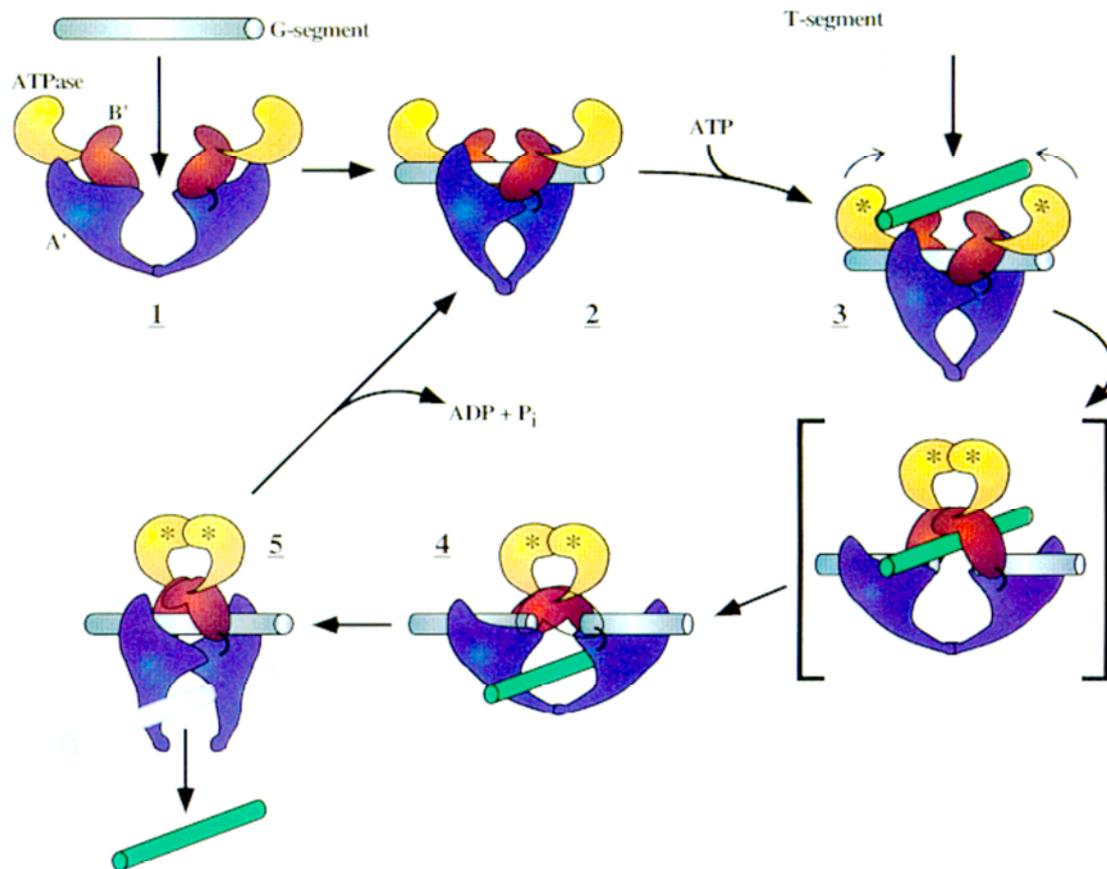


Abbildung 1-3: Molekulares Modell der katalytischen Reaktion der Typ IIA Topoisomerase in *Saccharomyces cerevisiae*, (modifiziert nach Berger, J. M., & Wang, J. C., 1996 [14]):

- 1- Ein DNA- Segment (G-Segment „gate“) bindet an die A'-Untereinheiten (blau) des freien Enzyms.
- 2- Die Bindung ruft eine Konformationsänderung hervor. Dieser Vorgang wird vermutlich von den B'-Untereinheiten (rot) mit deren freien ATPase-Domänen (gelb) unterstützt [65].
- 3- Die Bindung von ATP an die ATPase-Domänen der B'-Untereinheiten dimerisiert diese und erzeugt eine Kaskade von Konformationsänderungen, die zur Spaltung des G-Segments und Bindung eines T-Segments („transfer“) an das Enzym führen. Ein möglicher Zwischenschritt ist in Klammern dargestellt.
- 4- Das T-Segment wird durch die Lücke im G-Segment transportiert, dafür vergrößert sich der Abstand zwischen den A'-Untereinheiten.
- 5- Durch die Trennung der A'-Untereinheiten wird das transportierte T-Segment freigelassen und das G-Segment wieder religiert. Nach der ATP-Hydrolyse erlangen die B'-Untereinheiten ihre Ausgangskonformation zurück und ein weiterer Reaktionszyklus kann beginnen.

1.3.2.4 Topoisomerase IV

Die Topoisomerase IV gehört ebenso wie die Gyrase in die Gruppe der Typ IIA-Topoisomerasen [97]. Sie ist ein Tetramer, das aus zwei C- und zwei E-Untereinheiten (C_2E_2) besteht. Diese Untereinheiten werden durch die Gene *parC* und *parE* (in *Staphylococcus aureus* *grlA* und *grlB* genannt) codiert. Obwohl sie eine fast 40%ige Aminosäure-Homologie mit den entsprechenden A- und B-Untereinheiten der Gyrase aufweisen [97, 133, 193], übernehmen beide Topoisomerasen verschiedene Aufgaben in der Zelle. Die Hauptaufgabe der Topoisomerase IV besteht in der Trennung der durch die Replikation entstandenen Catenane [38, 82, 139]. Diese Decatenierungsaktivität der Topoisomerase IV ist für die Segregation der Tochterchromosomen notwendig [134]. Topoisomerase IV ist zudem in der Lage, superspiralisierte DNA zu relaxieren. Positive Superhelices werden dabei als Substrat bevorzugt und erleichtern dadurch das Fortschreiten der Replikationsgabel [33]. Bei der Relaxierung der negativen Superhelices spielt Topoisomerase I die wichtigere Rolle. Untersuchungen, die die Relaxierungsaktivität von Topoisomerase I und IV miteinander verglichen haben, ergaben, dass die Topoisomerase I die negativ superspiralisierte DNA sechsmal schneller relaxiert als Topoisomerase IV, wobei die letzte im Gegensatz zu Topoisomerase I die DNA fast vollständig relaxieren kann [193]. Es wird angenommen, dass der Reaktionsmechanismus der Topoisomerase IV dem der Gyrase ähnelt. Ein wichtiger Unterschied ist jedoch, dass das gebundene DNA-Segment nicht um das Enzym gewunden wird. Daher wird eine intermolekulare Strangpassage favorisiert [192].

1.4 Regulation der DNA Superspiralisierung

Die für die Zelle essentielle Aufrechterhaltung des negativen Superspiralisierungsgrades innerhalb bestimmter Grenzen wird durch Regulation vor allem der Topoisomerasen I und II (Gyrase) auf den Ebenen der Substratspezifität (i), der antagonistischen Enzymaktivität (ii) und der Genexpression (iii) sichergestellt.

i- Substratspezifität

Das bevorzugte Substrat der Topoisomerase I ist negativ superspiralisierte DNA [176]. Die Enzymaktivität nimmt mit Erhöhung des negativen Superspiralisierungsgrades zu, wobei die DNA von Topoisomerase I im Gegensatz zu Topoisomerase IV

nicht vollständig relaxiert wird [113, 193]. Gyrase zeigt hohe Affinität zu positiv superspiralisierter und relaxierter DNA, während die Affinität zu negativ superspiralisierter DNA gering ist [164].

ii- Antagonistische Enzymaktivität

Während die Hauptfunktion der Topoisomerase I in der Relaxierung der negativen Superspiralisierung der DNA besteht [113], katalysiert Gyrase die gegenläufige Reaktion und führt negative Superspiralisierung in relaxierte und positiv superspiralisierte DNA ein [62, 146].

iii- Enzymexpression (reziproke Transkriptionskontrolle)

Durch eine überdurchschnittlich superspiralisierte DNA wird die Expression des Strukturgens der Topoisomerase I *topA* induziert. Die Transkription von *topA* wird dabei durch mehrere Promotoren (P1, P2, P3, P4 und P5) in der 5'-Kontrollregion reguliert, die auf Veränderungen in der DNA-Superspiralisierung reagieren [171, 173]. Die Transkription der Gyrasegene *gyrA* und *gyrB* wird hingegen durch Relaxierung der DNA erhöht, wobei die Transkription von *gyrA* empfindlicher auf Veränderungen der DNA-Superspiralisierung reagiert als die von *gyrB* [116, 125].

Diese Regulation der negativen Superspiralisierung, die auf unterschiedlichen Ebenen der Transkription, Enzymaktivität und Substratspezifität wirkt, wird als homöostatische Kontrolle bezeichnet [41, 116, 141]. Durch diese dreifache Kontrolle wird eine schnelle Anpassung der DNA-Superspiralisierung an interne und externe Einflüsse garantiert.

1.5 Hemmstoffe der Topoisomerasen

Die Topoisomerasen bieten wegen ihrer essentiellen Bedeutung für die Bakterienzellen und ihrer ubiquitären Verbreitung in allen bislang untersuchten bakteriellen Infektionserregern ein ideales Ziel für Antibiotika. Für die seit 1962 eingesetzten 4-Chinoloncarbonsäuren wurde Gyrase erst 1977 als Zielstruktur identifiziert [63, 64, 163].

Neben den von *Streptomyces sp.* produzierten Aminocumarinen und Cyclothialidinen wird das von *Fusidium viridae* produzierte Terpenoid-Antibiotikum Clerocidin sowie das von *Nocardia*-Spezies produzierte Glycocinnamoylsperimidin Cinodin zu den

Inhibitoren der Gyrase gezählt [115]. Solche Verbindungen werden wahrscheinlich als Schutz vor Infektionen produziert. Einige *Enterobacteriaceae* wie *E. coli*, die das Plasmid pMccB17 oder ein Derivat davon besitzen, produzieren den Gyrase-Inhibitor Microcin B17 (Glycin reiches Peptid), der nach Aufnahme von anderen Stämmen deren Gyrase irreversibel hemmt [80, 175].

Je nach Wirkungsmechanismus und Angriffspunkt werden Inhibitoren der GyrA- (A-Untereinheit) und der GyrB- (B-Untereinheit) unterschieden.

Zu den wichtigsten GyrA-Hemmstoffen zählen die Chinolone, von denen sich inzwischen mehrere, durch chemische Modifikation der Substituenten am Grundgerüst erhaltene, klinisch hoch wirksame Derivate der Fluorchinolone ableiten [Übersichten bei 50, 79, 90, 115, 121]. Diese haben in gramnegativen Bakterienspezies neben der Gyrase die Topoisomerase IV als sekundäres Target [10, 78, 99]. In einigen grampositiven Spezies, wie z.B. Staphylokokken, ist jedoch Topoisomerase IV die empfindlichere Zielstruktur für Fluorchinolone, während Gyrase das sekundäre Target darstellt [56, 58, 100]. Neuere Chinolonderivate, wie Sitafloxacin oder Clinafloxacin, weisen im Vergleich zu Vertretern älterer Generationen eine verbesserte Aktivität auf beide Zielstrukturen auf [91].

Die bakterizide Wirkung der Chinolone beruht auf der Verhinderung der Religation des gespaltenen DNA-Doppelstrangs (Abbildung 1-3). Sie binden an den Gyrase-DNA Komplex und formieren dabei stabile ternäre Komplexe, die das Voranschreiten von Helicasen [83] und RNA-Polymerasen [184] blockieren und dadurch die Replikation und Transkription beeinträchtigen. Topoisomerase IV bildet ebenfalls mit Chinolonen stabile ternäre Komplexe [17]. Durch die Replikationshemmung wird eine SOS-Antwort induziert, die die Zellteilung verhindert [137, 138]. Der durch die SOS-Antwort hervorgerufene Zellteilungstopp hat die Filamentierung der Zellen [34], den Zusammenbruch der Membranintegrität und letztlich den Zelltod zur Folge [46].

Zu den wichtigsten Vertretern der GyrB-Hemmstoffe zählen die aus *Streptomyces sp.* gewonnenen Aminocumarine (Novobiocin, Coumermycin A1, Clorobiocin) und Cyclothialidine. Sie sind katalytische Inhibitoren der Gyrase, die durch ihre Bindung an die B-Untereinheit der Gyrase deren Konformation so ändern, dass die Affinität für ATP verringert ist [114, 123]. Aminocumarine und Cyclothialidine können aufgrund ihrer großen Molekülmasse die äußere Membran der gramnegativen Bakterien nur

schlecht passieren [89]. Sie besitzen deswegen eine geringe klinische Relevanz und werden nur selten gegen Infektion durch pathogene grampositive Spezies eingesetzt. In einem von Fernandes et al. durchgeführten Screening von 72.000 Verbindungen wurden drei Substanzen identifiziert, die die Topoisomerase I spezifisch hemmten. Diese Substanzen zeigten allerdings schwache Aktivität gegen *E. coli* (MHK>32 µg/ml) und die meisten anderen Bakterienspezies [55]. Hemmstoffe gegen die nicht essentielle Topoisomerase III wurden bisher nicht beschrieben.

1.6 Zielsetzung

Die Gyrase hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten als eine sehr effektive und selektive Zielstruktur für diverse Antibiotika erwiesen. Die steigende Resistenzentwicklung auch gegen hochpotente Gyrase-Inhibitoren, wie die Fluorchinolone der neuesten Generation, macht jedoch die Suche nach neuen Hemmstoffen erforderlich. Dieses für Bakterien essentielle Enzym eignet sich dabei besonders als Zielstruktur.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein Testsystem zu etablieren, das ein Screening von neuen Hemmstoffen der bakteriellen Gyrase und Topoisomerase I ermöglicht. Mit Hilfe des Reportergensystems sollten Veränderungen des Superspiralisierungsgrades aufgrund einer Hemmung von Topoisomerase I oder Gyrase *in vivo* sowohl mit isolierten Reinsubstanzen als auch mit Naturstoffextrakten detektierbar gemacht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

In der folgenden Tabelle sind alle Bakterienstämme enthalten, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Die genetischen Marker sowie die Herkunft bzw. Referenz der Stämme sind ebenfalls aufgelistet.

Tabelle 2-1 Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Genetischer Marker	Referenz / Herkunft
<i>E. coli</i> ¹	DH5 α	F ⁻ 80d/lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF). U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ thi-1, gyrA96, relA1	Gibco-BRL
	JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), supE44, relA1, λ ⁻ , Δ (lac-proAB), [F', tra36.proAB, lac1qZ Δ M15]	Promega
	JTT1	Wildtype (WT)	Sternglanz <i>et al.</i> 1981
	RS2	topA10	Sternglanz <i>et al.</i> 1981
	KD112	gyrB226	Steck <i>et al.</i> 1993
	WT	Wildtype	Heisig & Tschorny, 1994
	WT-3-1	Ser83-leu + Asp87-Gly	Bagel, Diss., 1998
	DE112	RFM443, tolC:miniTn10 (tetR, McConkey-)	Austin, E.A., 1990
	RFM443	K-12, rpsL200 (strR), galK2, Dlac74 (lac ⁻)	Menzel, R., 1989
	ER2420	F ⁻ , ara-14, leu, fhuA2, Δ (gpt-proA)62, lacY1, glnV44, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl -1, Δ (mcrC-mrr)	New Englang Biolabs
	C600SN	thr ⁻ , leuB6, fhuA21, lacY1, glnV44 (AS), LAM ⁻ , el4, glpR200, thi ⁻ , Str ^r , Nal ^r	Weisser, J. 1988
	<i>S. Tm.</i> ²	<i>S. Tm.</i> M415	WT
<i>S. Tm.</i> Nal2ori		<u>gyrA-Mutationen:</u> Gly (GGT)75 zu Ala(GCT) Asp(GAC)87 zu Gly(GGC) Ser(AGC)876 zu Ile(ATC)	Dr. J. Beer, Universität Leibzig

Fortsetzung Tabelle 2-1		
<i>S. Tm.</i> Nal2-passage	<u><i>gyrA</i>-Mutationen:</u> Gly (GGT)75 zu Ala(GCT) Asp(GAC)87 zu Gly(GGC) Ser(AGC)876 zu Ile(ATC)	Dr. J. Beer, Universität Leipzig
<i>S. Tm. vacT</i>	<u><i>gyrA</i>-Mutationen:</u> Trp(TGG)59 zu Arg(AGG) Gly (GGT)75 zu Ala(GCT) Asp(GAC)87 zu Gly(GGC) Ser(AGC)876 zu Ile(ATC)	Lohmann Animal Health, Cuxhaven, Deutschland
<i>Strept.</i> ³	<i>Strept.</i> <i>caeruleus</i>	Prof. Dr. L. Heide, Universität Tübingen

¹ *Escherichia coli* (*E. coli*); ² *Salmonella Typhimurium* (*S. Tm.*); ³ *Streptomyces* (*Strept.*)

2.1.2 Vektoren

Tabelle 2-3 gibt die in dieser Arbeit eingesetzten Vektoren unter Angabe ihrer Größe, ihrer relevanten genetischen Marker und ihrer Herkunft wieder.

Tabelle 2-3: Vektoren

Plasmid	Größe bp	Genetische Marker	Herkunft
pBR322	4360	Tet ^r , Amp ^r	Bolivar, <i>et al.</i> , 1977
pPHB90	6531	Tet ^r , <i>ptopA-luc</i>	Diese Arbeit
pPHB91	6269	Tet ^r , <i>pgyrA-luc</i>	Diese Arbeit
pACY177	3941	Tet ^r , Kn ^r	New England Biolabs
pPHB92	6108	Kn ^r , <i>ptopA-luc</i>	Diese Arbeit
pPHB93	5864	Kn ^r <i>pgyrA-luc</i>	Diese Arbeit
pGEM- <i>luc</i>	4933	Amp ^r , <i>luc</i>	Promega
pGEM5zf(+)	3003	Amp ^r	Promega
pGEM5zf(+) ^{T21}	5131	Amp ^r , <i>ptopA-luc</i>	Abu Mraheil, 1999
pGEM5zf(+) ^{G67}	4869	Amp ^r <i>pgyrA-luc</i>	Abu Mraheil, 1999
pBP507	9198	Gent ^r , Amik ^r , Kan ^r	Heisig, 1993
pPHB94	11368	Gent ^r , Amik ^r , <i>ptopA-luc</i>	Diese Arbeit
pPHB95	11106	Gent ^r , Amik ^r , <i>pgyrA-luc</i>	Diese Arbeit

2.1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit für die Klonierung und Sequenzierung eingesetzten Desoxyoligonukleotide sind unter Eingabe deren Sequenz und Länge in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz 5' → 3'	Bindungsstelle
GYRA5-1	25	CGTCTGCAGCGATCTCTTCGTGGTC <i>PstI</i>	<i>Luc</i> : -182 bis – 200
GYRA3-1	34	GTTTTTGGCGTCTTCCATCTAACCGCTA TCCCTC	<i>Luc</i> : +1 bis +18 <i>gyrA</i> : -1 bis –16
TOPA5-1	26	GAGACTGCAGCGTATCCTCATGCTCA <i>PstI</i>	<i>topA</i> : -444 bis – 461
TOPA3-1	36	GTTTTTGGCGTCTTCCATATTCACCTTACC TAATTT	<i>Luc</i> : +1 bis +18 <i>topA</i> : -1 bis –18
LUC5-1	36	AAATTAGGTAAGGTGAATATGGAAGACGC CAAAAAC	<i>Luc</i> : +1 bis +18 <i>topA</i> : -1 bis –18
LUC5-2	34	GAGGGATAGCGGTTAGATGGAAGACGC CAAAAAC	<i>Luc</i> : +1 bis +18 <i>gyrA</i> : -1 bis –16
LUC3-3	28	GTCCTGCAGTCGGAGGATTACAATAGCT <i>PstI</i>	<i>Luc</i> : -1686 bis -1704
LUCM	23	TCACTGCATACGACGATTCTGTG	<i>Luc</i> : -225 bis –248
LUCB	23	CATTTT CAA GTA TTCCGCGTACG	<i>Luc</i> : -154 bis –176
LUCO	23	GGAGCACGGAAAGACGATGACGG	<i>Luc</i> : -1460 bis -1502
LUCI-1	21	GATTCTCGCATGCCAGAGATC	<i>Luc</i> : -652 bis –672
LUCI-2	21	GGCTCACTGAGACTACATCAG	<i>Luc</i> : -1021 bis -1041
pBRK1	22	CCAGATTTATCAGCAATAAACC	pBR322: 3453 bis 3474
pBRK2	25	CCAACTTACTTCTGACAACGATCGG	pBR322: 3732 bis 3756
pBRK3	29	CCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGAGC	pBR322: 305 bis 333
pBRK4	22	GCAAGGAATGGTGCATGCAAGG	pBR322: 358 bis 379
NS1	24	CCAATGATGTTACAGATGAGATGG	pBP507: 469 bis 492
NS2	27	CCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACC	pBP507: 608 bis 634

2.1.4 Nährmedien

Soweit nicht anders genannt, beziehen sich alle Angaben auf ein Volumen von einem Liter. Sämtliche Nährböden und Nährlösungen wurden unmittelbar nach der Einwaage gelöst und autoklaviert. Empfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert. Die Puffer wurden ebenfalls sterilisiert.

Tabelle 2-4: Nähragar

Medium	Bezugsquelle bzw. Herstellung
Chinablau-Laktose-Agar	OXOID, Wesel
Standard Nähragar No.1	Merck, Darmstadt
M9-Agar	15 g Agar in 800 ml H ₂ O autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen; 1 ml 1M MgSO ₄ , 0,1 ml 1M CaCl ₂ , 100 ml 10xM9 Salze, 20 ml 20% Glucose zufügen; 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl
LB-Agar, pH 7,3	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10g NaCl, 14 g Agar

Tabelle 2-5: Nährbouillon

Bouillon	Bezugsquelle bzw. Herstellung
Standard Nährbouillon No.1	Merck, Darmstadt
Mueller-Hinton-Bouillon	OXOID, Basingstoke, England
M9 Minimalmedium	750 ml H ₂ O autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen; 2 ml 1M MgSO ₄ , 0,1 ml 1 M CaCl ₂ , 200 ml 5xM9 Salze, 20 ml 20% Glucose zufügen, auf 1 L auffüllen
LB-Medium, pH 7,3	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl
Isosensitest-Bouillon	Oxoid, Basingstoke, England
CDM-Medium (Novobiocinproduktionsmedium)	Tri-Natrium-Citrat*2H ₂ O 6,0 g; L-Prolin 6,0 g; K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O 2,0 g; (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,5 g; NaCl 5 g; MgSO ₄ *7H ₂ O 2,05 g; CaCl ₂ *2H ₂ O 0,4 g; FeSO ₄ *7H ₂ O 0,2 g; ZnSO ₄ *7H ₂ O 0,1 g (Kominck,1972)

2.1.5 Enzyme

In **Tabelle 2-6** sind die verwendeten Enzyme aufgeführt. Die Puffer für die Enzyme werden von den Firmen in mitgeliefert und wurden gemäß den Vorschriften der einzelnen Hersteller verwendet.

Tabelle 2-6: Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Expand High Fidelity Polymerase®	Roche, Mannheim
Phosphatase, alkalische, Shrimp	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rapid DNA Ligation Kit mit T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim Gibco/BRL, Eggenstein NEB, Frankfurt
RNase H	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase Sequencing Grade	Promega, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

2.1.6 Chemotherapeutika

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemotherapeutika sind unter der Angabe der Bezugsquelle in **Tabelle 2-7** aufgeführt.

Tabelle 2-7: Chemotherapeutika

Chemotherapeutika	Bezugsquelle
Ampicillin	Bayer HealthCare AG, Leverkusen
Tetracyclin	Hoechst AG, Frankfurt
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Ciprofloxacin	Bayer HealthCare AG, Leverkusen
Norfloxacin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Novobiocin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Moxifloxacin	Bayer HealthCare AG, Leverkusen
Kanamycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Coumermycin A	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Gentamicin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Amikacin	Bristol-Meyers

2.1.7 Getestete Reinsubstanzen

Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Reinsubstanzen sind unter der Angabe der Bezugsquelle in **Tabelle 2-8** aufgeführt.

Tabelle 2-8: Reinsubstanzen

Reinsubstanzen	Herkunft
Helenalin	Priv.-Doz-Dr. T. Schmidt, Uni. Düsseldorf
Herniarin	Roth, Karlsruhe
Rubradirin	Prof. Dr. L. Heide, Uni. Tübingen
Simocyclinon	Prof. Dr. L. Heide, Uni. Tübingen
Xanthotoxin	Roth, Karlsruhe

2.1.8 Chemikalien

Chemikalien, die in der nachfolgenden **Tabelle 2-8** aufgeführt sind, wurden mit dem Reinheitsgrad „reinst“ oder „p.a.“ bezogen.

Tabelle 2-9: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose Neo (DNase frei)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BSA (Albumin bovine Fraction V)	serva, Heidelberg
Chrom Biodip® (MTT Nachweisreagenz)	Merck KgaA, Darmstadt
dNTPs	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KgaA, Darmstadt
EDTA (Titrplex III)	Merck KgaA, Darmstadt
Ether	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt
Ficoll	Merck KgaA, Darmstadt
Glucose	Merck KgaA, Darmstadt
Glycerin 87%	Merck KgaA, Darmstadt
Glycerin 99%	serva, Heidelberg
IPTG	Boehringer, Mannheim
L-Prolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mineralöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Molekulargewichtsmarker	Biorad Laboratories GmbH, München
Chrom Biodip® (MTT Nachweisreagenz)	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KgaA, Darmstadt
Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS	Roth, Karlsruhe
Smartladder (Molekulargewichtsmarker)	Eurogentec, Belgien

Fortsetzung Tabelle 2-9

Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Prolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.9 Puffer und Lösungen

Die nachfolgende **Tabelle 2-10** gibt die verwendeten Puffer und Lösungen an.

Tabelle 2-10: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA
TBE-Puffer	89mM Tris; 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
TE-Puffer, pH 8,0 6x Ladepuffer	10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0 20% Ficol; 0,12% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol FF
<u>Plasmid Midi Kit, QIAGEN, Hilden</u>	
Puffer P1	100 µg RNase A; 50 mM Tris HCl; 10 mM EDTA, pH 8,0
Puffer P2	200 mM NAOH; 1% SDS
Puffer P3	3 M KAc, pH 5,5
Puffer QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0 ; 15% Isopropanol
Puffer QC	1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0 ; Isopropanol
Puffer QF	1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 ; 15% Isopropanol
<u>QIAquick-spin, PCR Purification/Gelextraktion Kit, QIAGEN, Hilden</u>	
Puffer EP	Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCL, pH 8,5
Puffer PB	Bindungspuffer: enthält Guanidin Hydrochlorid
Puffer PE	Waschpuffer: ohne Angabe
Puffer QG	Bindungspuffer: enthält chaotrope Salze
<u>Sequencer Kit: Applied Biosystems, Weiterstadt</u>	
ABI PRISM® BigDye™	AmpliTaq® DNA Polymerase
Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix Y1.1	Desoxynukleotide; MgCl ₂ ; Tris-HCL, pH 9,0
Template Supression Reagent (TSR)	Denaturierungsreagenz
HiDi Formamid	Denaturierungsreagenz

Fortsetzung Tabelle 2-10	
POP6™	Performance Optimized Polymer zur Auftrennung der DNA- Fragmente
Sequenzierpuffer 310 GA	Ohne Angaben
<u>Luciferase Assay System</u>	
Luciferase Assay Reagent (LAR)	Ohne Angaben, enthält Luciferin, ATP und Magnesium
1x Cell Culture Lysis Reagent (CCLR)	25 mM Trisphosphat, pH 7,8; 2 mM DDT; 2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N,N- Tetraessigsäure; 10% Glycerol; 1% Triton X-100
Lysis Mix	200 µl CCLR; 100 µl Lysozym 5 mg/ml; BSA 5mg/ml;

2.1.10 Geräte und Material

Die im Rahmen der Untersuchungen verwendeten Geräte und Materialien sind unter Angabe der Herstellerfirmen in **Tabelle 2-11** aufgelistet.

Tabelle 2-11: Geräte und Material

Gerät	Hersteller
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA
Mikrotiterplatten	
1- Luminometer (Luciferase-Aktivität)	DYNATEC MicroFOUR, USA
2- Luminometer (OD-Bestimmung)	VWR-International, Hamburg
3- MHK-Bestimmung	VWR-International, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Osterode
DNA-Synthesizer 391	Applied Biosystems, Pfungstadt
Electrophoresis Power Supply	LKB Pharmacia, Freiburg
Filterspitzen, variabel	Biozym Diagnostik GmbH, H. Oldendorf
Gelelektrophorese-Apparaturen Typ Comphor Midi und Mini	Biozym Diagnostik GmbH, H. Oldendorf
Gilson Kolbenhubpipetten, variabel	Abimed, Düsseldorf
Inolab pH-Meter	WTW, Weilheim
Küvetten (halb Mikro)	Roth, Karlsruhe
Luminometer (Lucy 2)	Anthos, Krefeld
Milli-Q synthesis (Reinstwasseranlage)	Millipore (H ₂ O), Schwalbach
Rotationsdampfer Rotavapor R-200	Büchi, Essen
Schüttelinkubator Serie25	New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA
Schüttelinkubator Certomat R+H	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen

Fortsetzung Tabelle 2-11

Schüttelwasserbad Typ 1083	Gesellsch. F. Labortechnik, Hannover
Spectralphotometer Hitachi 150-20	Colora, Lorch
Spectralphotometer Cary 50	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Speed Vac SC 100	Savant, USA
Sterilfilter	Sartorius AG, Göttingen
Thermocycler 9700	Perkin Elmer Corp., Foster City, USA
Thermocycler UNO	Biometra, Göttingen
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Videodokumentationsanlage, GDS-System	INTAS, Göttingen
Videodokumentationsanlage BioDoc system	Biometra, Göttingen
Vortex Genie2	Scientific Industries Inc. Bohemia, USA
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Kendro, Hamburg
Biofuge fresco	Kendro, Hamburg
Biofuge RS28	Heraeus, Osterode
Rotoren #3331, #3040 und #3335	
Biofuge A	Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge J2-21,	Beckmann, Düsseldorf
Rotoren JA-20 und JA-21	

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Dauerkulturen

2.2.1.1 Glycerindauerkulturen

Zwei bis drei Bakterienkolonien wurden von einer, über Nacht inkubierten, Chinablau-Lactose-Agarplatte mit einem Glasstab abgenommen und in einer Standard-No.I-Nährbouillon-Glycerin-Lösung (das Verhältnis Glycerin : Standard-No.I-Nährbouillon betrug 1 : 1) suspendiert. Diese Kulturen wurden bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde Material entnommen und auf einen geeigneten Nährboden ausgestrichen.

2.2.1.2 Stichkulturen

Eine Bakterienkolonie wurde von einer über Nacht bebrüteten Chinablau-Lactose-Agarplatte abgenommen und in Weichagar, bestehend aus 10 mg Standard Nr.II-Nähragar, 3 mg Standard-No.I-Nährbouillon und in 1 ml Aqua dest., angeimpft. Die Dauerkulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, danach fest verschlossen und bei RT gelagert.

2.2.2 Bestimmung der Keimzahl

Die Anzahl an Zellen, die durch wiederholte Zellteilung eine Kolonie bilden können, wurde wie folgt bestimmt: Aus der zu untersuchenden Bakteriensuspension wurden 0,5 ml entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung sukzessive 1:10 verdünnt. Die Anzahl der Verdünnungsschritte richtete sich nach der optischen Dichte der Bakterienkultur bzw. der etwa erwarteten Keimzahl. Von den letzten vier Verdünnungen wurden jeweils 50 µl auf ein Viertel einer Agarplatte ausplattiert und 24h bei 37°C inkubiert. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden ausgezählt und auf 1ml Bakteriensuspension bezogen (KBE/ml).

2.2.3 Bestimmung der MHK

Als minimale Hemmkonzentration (MHK) eines Antibiotikums gilt diejenige Konzentration, die das sichtbare Wachstum von Bakterien deutlich hemmt. Die Bestimmung der MHK wurde mittels des Mikrodilutionsverfahrens gemäß DIN 58940-8 [37] durchgeführt.

Es wurde eine lineare Verdünnungsreihe des Antibiotikums in H₂O durch serielle 1:2 Verdünnung hergestellt. Je 50 µl einer Verdünnungsstufe wurden in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Auf diese Weise wurden pro Reihe elf Vertiefungen der Platte mit absteigenden Antibiotikumkonzentrationen befüllt, während in die zwölfte Vertiefung als Wachstumskontrolle steriles Wasser gegeben wurde. Das erforderliche Inokulum von 5×10^5 KBE/ml wurde hergestellt, indem von einer 18-24 Stunden alten Bakterienkultur auf MH-Agar einzelne Kolonien in MH-Bouillon suspendiert, und die optische Dichte auf den McFarland-Standard 0,5 ($OD_{560} = 0,120$) eingestellt wurde. Dies entspricht einer Keimzahl von ca. 10^8 KBE/ml. Diese Suspension wurde 1:100 mit KAMHB verdünnt, so dass sich eine Keimzahl von etwa 1×10^6 KBE/ml ergab. Die mit Antibiotikumlösung beschickten Mikrotiterplatten wurden mit 50 µl dieser Bakteriensuspension pro Vertiefung beschickt. Nach 18-20 h Bebrütung bei 37°C wurde die Mikrotiterplatte abgelesen. Teilweise wurden zur Bestimmung der MHK auch MICRONAUT-S-Mikrotitrationsplatten der Firma MERLIN Diagnostika GmbH (Bornheim) eingesetzt, die Antibiotika in dehydratisierter Form enthielten.

2.2.4 Bestimmung der MBK

Während die MHK nur die Hemmung des Wachstums berücksichtigt, ermöglicht die Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) Aussagen zur Bakterizidie eines Antibiotikums. Als MBK gilt diejenige Konzentration, die nach 24h die Keimzahl um mehr als 99,9% reduziert [124].

Die Bestimmung der MBK erfolgte im Anschluss an die Bestimmung der MHK, indem aus vier Vertiefungen entsprechend 1/2 x MHK bis 4 x MHK nach Durchmischung jeweils 50 µl entnommen wurden. Jedes Aliquot wurde auf einer einzelnen antibiotikumfreien MH-Agarplatte ausplattiert und somit das Problem eines Antibiotikum-Übertrags verhindert [9]. Die Kolonien wurden nach Bebrütung (24 h bei 37°C) ausgezählt.

2.2.5 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide

Bei einer Wellenlänge von 260nm wird die 1:500 verdünnte Primerlösung photometrisch vermessen. Die Konzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$$c \text{ [pmol/ } \mu \text{ l]} = \frac{A_{260} \cdot \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl der Basen} \cdot 0,01}$$

2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die von Kary Mullis und Mitarbeitern entwickelte *in vitro* Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen wird als Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bezeichnet [151]. Grundprinzip der PCR ist die zyklische Amplifizierung von DNA-Fragmenten, wobei die Zahl der Fragmente durch sukzessive Verdopplung exponentiell steigt und theoretisch nach n-tem Zyklus 2^n DNA-Moleküle im Ansatz vorliegen. In der Praxis gilt jedoch eher folgende Gleichung:

$$N = N_0 \times (1 + E)^n$$

Hierbei ist N die Anzahl der amplifizierten Moleküle, N_0 die Molekülzahl vor Amplifikation und n die Zyklenzahl. E ist die Effizienz der Reaktion und besitzt einen Wert zwischen 0 (keine Amplifikation) und 1 (maximale Amplifikation). Dieser Wert hängt sehr stark vom Optimierungsgrad ab und ändert sich zudem außerhalb der exponentiellen Phase der PCR. Aufgrund stochastischer Effekte beginnt die

exponentielle Phase der Amplifikation erst nach etwa 10 Zyklen und endet aufgrund einer Reaktionshemmung nach etwa 30 Zyklen. Weitere Zyklen führen dann zunächst zu einer linearen und schließlich keiner weiteren Amplifikation (Plateau-Effekt). Ursächlich für diese Hemmung sind u. a. das während der PCR gebildete Pyrophosphat, die abnehmende Aktivität der Polymerase, und eine Konkurrenz von Primer und Produkt um die Anlagerung. Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist die Kenntnis der flankierenden Sequenzbereiche des zu amplifizierenden DNA-Fragments, da aus ihnen die Sequenz der Starter-Oligonukleotide (Primer) abgeleitet wird.

In dieser Arbeit wurde die PCR gemäß dem Standardansatz in Tabelle 2-12 durchgeführt. Für Ansätze mit einem Volumen von 20 μl wurde jeweils 1/5 der angegebenen Volumina eingesetzt.

Tabelle 2-12: PCR-Standardansatz (100 μl)

Volumen	Komponente
5 μl	Template (100 ng/ μl)
2 μl	Primer 1 (10 pmol/ μl)
2 μl	Primer 2 (10 pmol/ μl)
10 μl	10 \times Polymerase-Puffer
6 μl	MgCl ₂ (25 mM)
2,5 μl	dNTP-Mix (2 mM)
5 μl	DMSO (optional)
0,5 μl	Taq-Polymerase (5U/ μl)
ad 100 μl	Reinstwasser

Ein Zyklus der PCR besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Probe (aus Chromosom oder Plasmid) in Einzelstränge.
2. Anlagerung (Annealing) der Primer an die komplementäre Sequenz in der DNA-Probe.
3. Verlängerung (Extension) der 3'OH-Enden der angelagerten Starter-Oligonukleotide durch enzymkatalysierte Addition von komplementären Desoxynukleotiden.

Beim Einsatz chromosomaler DNA als Template wurden etwa 3-5 Kolonien einer frischen ÜN-Agarplatte in 200 µl Reinstwasser resuspendiert und 15min aufgeköcht. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (13.000 Upm, RT, 5 min) und 5 µl des klaren Überstands als Template verwendet.

Die Auswahl des Temperaturprofils ist für jede PCR spezifisch. Die Anlagerungstemperatur (T_A) sollte 4°C unterhalb der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer liegen. T_m ergibt sich aus der Basenzusammensetzung der Primer und berechnet sich wie folgt:

$$T_m [^\circ\text{C}] = [(\sum dGTP + \sum dCTP) \times 4] + [(\sum dATP + \sum dTTP) \times 2]$$

Die Dauer der Verlängerungsreaktion (t_v) ist von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes abhängig. Die hier eingesetzten thermostabilen Polymerasen synthetisieren etwa 1kb pro min.

Denaturierung:	94°C	5 min	
Anlagerung:	T_A °C	30 s	25-35x
Verlängerung:	72°C	t_v s	
Denaturierung:	94°C	30 s	
Anlagerung:	T_A °C	30 s	
Verlängerung:	72°C	5 min	

Die Überprüfung der PCR-Produkte fand mittels einer Agarose-Gelelektrophorese statt (2.2.7).

2.2.7 PCR-Fusions-Technick (SOEing)

SOEing (Splicing by overlap extension) ist eine spezielle Anwendung der PCR und ermöglicht eine exakte Rekombination von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Herkunft.

Das Prinzip der Verlängerung überlappender Sequenzen (Overlap-Extention) wie in Abbildung 2-1 dargestellt, beruht zunächst auf der Tatsache, dass eine Sequenz, die an das 5'-Ende eines Primers angehängt wird, sich nach abgeschlossener PCR am terminalen Bereich des amplifizierten Fragments befindet. Wird der Überhang so gewählt, dass er komplementär zu der Sequenz eines anderen Fragmentes ist, so hybridisiert er in einer nachfolgenden Reaktion mit dieser. Die durch die

Hybridisierung resultierenden 3'OH-Enden der überlappenden Sequenzen fungieren nun als Starter-Moleküle und werden durch die Expand High Fidelity Polymerase[®] mit Desoxynukleotiden verlängert, wobei das erwünschte rekombinante DNA-Molekül erzeugt wird.

In zwei getrennten Ansätzen werden zunächst die PCR-Produkte *ptopA* (oder *pgyrA*) und *luc* mit entsprechenden überhängenden Enden mittels PCR synthetisiert (Abbildung 2-1). In einer Folgereaktion gemäß Ansatz-I (Tabelle 2-13a), in der beide Produkte eingesetzt werden, entsteht durch Verlängerung der überlappenden Bereiche das rekombinante SOEing-Produkt *ptopA-luc* oder *pgyrA-luc*. Anschließend werden die äußeren Starter-Oligonukleotide zu Ansatz-II zugegeben (Tabelle 2-13b), um das entstandene SOEing-Produkt in ausreichender Menge zu amplifizieren.

Da die Taq-Polymerase bei der Amplifikation eine hohe Fehlerquote aufweist, werden die Fragmente mit der Expand High Fidelity Polymerase[®] hergestellt, da sie eine höhere Genauigkeit besitzt und dadurch mögliche PCR-Mutationen vermieden werden.

Ansatz I:

Tabelle 2-13a: SOEing Reaktionsansätze

Volumen	Komponente
Mix I:	
x µl	PCR-Fragment <i>ptopA</i> (oder <i>pgyrA</i>)
y µl	PCR- Fragment <i>luc</i>
1,25 µl	dNTP-Mix (10 mmol)
ad 25 µl	H ₂ O
Mix II:	
5 µl	10x Polymerase Puffer
z µl	MgCl ₂
0,75 µl	Expand High Fidelity Polymerase [®]
ad 25 µl	H ₂ O

Ansatz II:

Tabelle 2-13b: SOEing Reaktionsansätze

Volumen	Komponente
Mix I:	
10 µl	Ansatz I
2 µl	Starter-Oligonukleotid GYRA5-1 oder TOPA5-1 (10pmol)
10 µl	Starter-Oligonukleotid LUC3-3 (2 pmol)
2,25 µl	dNTP-Mix (10 mmol)
ad 55 µl	H ₂ O
Mix II:	
9 µl	10x Polymerase Puffer
x µl	MgCl ₂
0,75 µl	Expand High Fidelity Polymerase [®]
ad 45 µl	H ₂ O

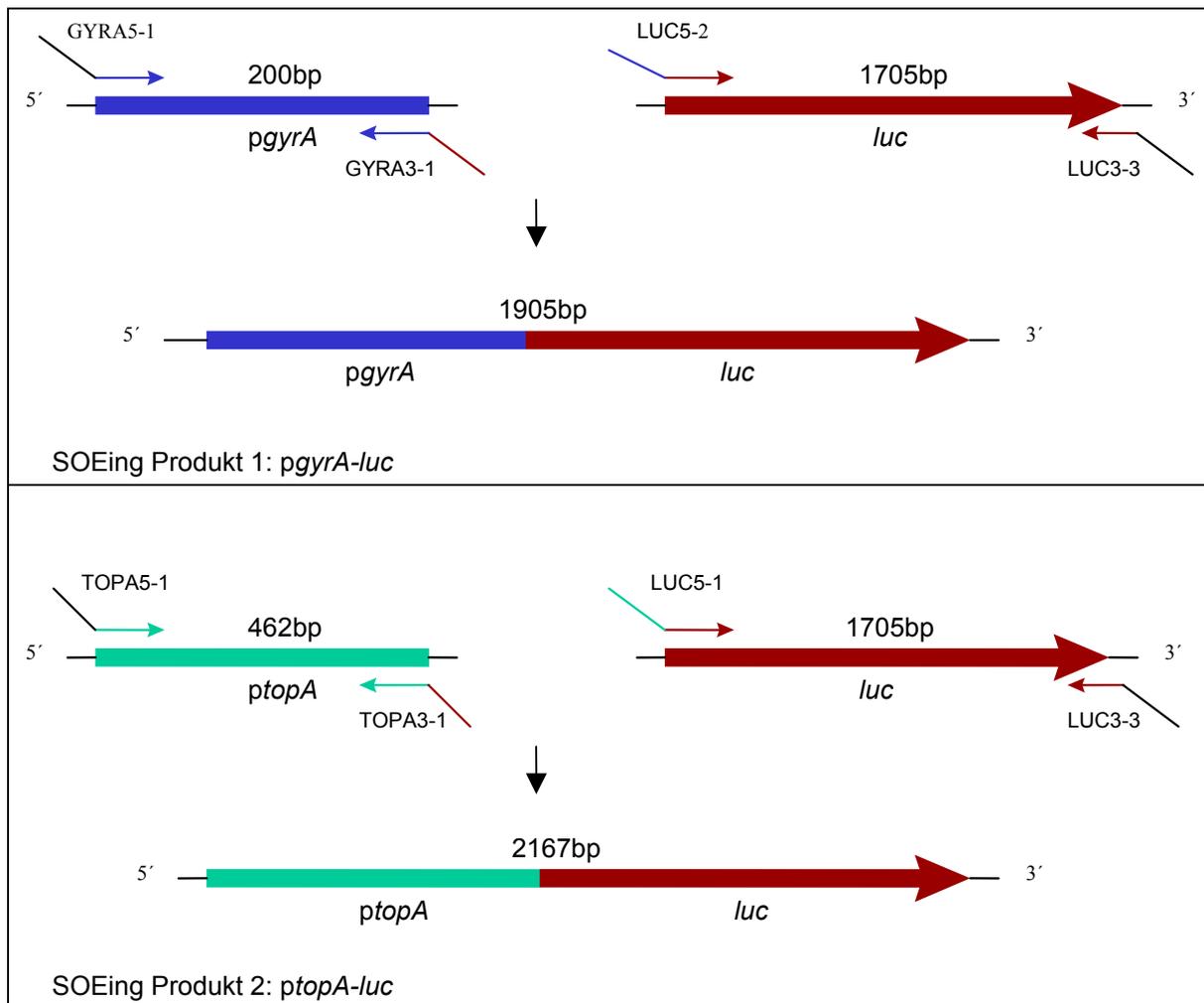


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung von SOEing und Bindungsstellen der Primer

2.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Um die Größe von linearisierten DNA-Molekülen zu ermitteln, werden diese im Agarosegel durch das Anlegen eines elektrischen Feldes getrennt. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste wandern DNA-Moleküle zur Anode. Die Agarosematrix bildet eine Art Molekularsieb, wobei die Wanderung größerer Fragmente stärker behindert wird als kleiner Moleküle. Die Laufstrecke der Moleküle ist dem Logarithmus der Basenpaare umgekehrt proportional.

Der Agaroseanteil der Gele betrug 0,8%-4%, abhängig von der erwarteten Größe der aufzutrennenden DNA. Die Agarose wurde in 0,5xTAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wurde Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben (Endkonzentration von 0,3 µg/ml). Ethidiumbromid interkaliert mit DNA-Doppelsträngen, wodurch diese unter UV-Licht sichtbar werden. Nach der Polymerisation des Gels, wurde es mit 0,5xTAE-Puffer überschichtet. Die Proben

(meist 10 µl eines PCR-Ansatzes) wurden mit 1/6 Vol. Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Es wurde ein elektrisches Feld von 3 V/cm angelegt, bis die Proben in das Gel eingelaufen waren, dann wurde die Feldstärke auf 5 V/cm erhöht. Nach dem Lauf wurden die DNA-Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Videoanlage dokumentiert. Die Größe und Konzentration der DNA-Banden ließ sich mit Hilfe eines Markers (Smart Ladder) bestimmen, der ebenfalls separat auf das Gel aufgetragen wurde.

2.2.9 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

2.2.9.1 Extraktion von DNA Banden aus Agarosegelen

Für die Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in einem Falconröhrchen gewogen. Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden). Das Prinzip dieser Aufreinigung beruht auf der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an Silica-Gel-Membranen, wenn hohe Konzentrationen eines chaotropen Salzes vorliegen. Die Silica-Membran der QIAquick Spin-Säule™ kann bis zu 10 µg DNA binden. Störende Komponenten wie Primer, Nukleotide, Polymerase, Salze, Agarosereste etc. werden ausgewaschen.

Zu 100 mg Gelmatrix wurde 300 µl QG-1 Lösung pipettiert. Der Ansatz wurde 10 min im 50°C Wasserbad bis zur Auflösung der Agarose inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und stark geschüttelt.

Die Suspension wurde auf eine QIAquick-Säule pipettiert und nach einer einminütigen Einwirkzeit bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl QG-1 Lösung behandelt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Durch zweimaliges Zentrifugieren wurde der restliche Puffer von der Säule entfernt und diese an der Luft für 5min getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl 1mM Tris-Puffer, pH 8,5 nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Elution wurde durch erneuten Auftrag des ersten Eluats wiederholt, wodurch sich die Ausbeute um 15% erhöhte.

2.2.9.2 Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen

Für die Konzentrierung und Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen (z. B. PCR, Restriktionsverdau) wurde der Ansatz mit 5 Vol. PB-Puffer gemischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Nach 1 Minute Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde die Durchflussfraktion verworfen. Das Waschen der Säule und die Elution der DNA erfolgten wie unter (2.2.9.1) beschrieben.

2.2.9.3 Reinigung und Konzentrierung von DNA durch Ethanolfällung

Die DNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M NaAc (pH 5,4) und 2 Volumen absolutem Ethanol für 20 min bei -20°C gefällt. Die gefällte DNA wurde durch eine erste 30-minütige Zentrifugation bei $20.000 \times g$ und 4°C pelletiert. Das Ethanol wurde vorsichtig mittels Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet mit $400 \mu\text{l}$ 70% Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, $20.000 \times g$) wurde der Überstand wieder vorsichtig mittels Vakuumpumpe abgesaugt, das DNA-Pellet bei 37°C getrocknet und in dem gewünschten Volumen TE-Puffer oder 1mM Tris-Cl (pH 8,5) resuspendiert.

2.2.10 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Ein 1:200 verdünntes Aliquot der in TE-Puffer gelösten DNA wurde gegen den entsprechenden Leerwert spektralphotometrisch gemessen.

Es gilt für Doppelstrang-DNA: $1 \text{ O.D.}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$.

Für reine Doppelstrang-DNA gilt weiterhin: $\frac{\text{O.D.}_{260\text{nm}}}{\text{O.D.}_{280\text{nm}}} = 1,8$.

Nimmt der Quotient einen Wert größer als 1,8 an, so deutet dies auf Verunreinigungen durch RNA hin. Liegt er unterhalb von 1,8, so befinden sich Proteine in der Lösung.

2.2.11 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.11.1 Restriktionsverdau

Im Rahmen der Konstruktion rekombinanter Plasmide wurde die DNA mit Typ II Restriktionsendonukleasen verdaut, die eine spezifische palindrome Basensequenzen erkennen und innerhalb dieser schneiden. Durch die Hydrolyse entstehen glatte (blunt) oder kohäsive (sticky) Enden die eine erneute Verknüpfung ermöglichen.

Der Restriktionsverdau erfolgte gemäß dem Ansatz in Tabelle 2-14

Tabelle 2-14: Restriktionsansatz

Volumen	Komponente
x µl	DNA (0,25-1 µg/µl)
y µl	Restriktionsenzym (10 U/µl)
1/10	10x Restriktionspuffer
z µl	Aqua dest

Die Enzymmenge, die für einen vollständigen Verdau der DNA benötigt wird, ist von der Größe und Menge der DNA, der Anzahl der vorhandenen Schnittstellen sowie der Inkubationsdauer abhängig und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{48500 \text{ bp } (\lambda_{\text{DNA}}) \times \text{Schnittstellen}_{\text{DNA}} \times \mu\text{g DNA}}{\text{bp DNA} \times \text{Schnittstellen}_{\lambda_{\text{DNA}}} \times \text{h}} = \text{Unit}_{\text{Enzym}}$$

Für den Verdau von Plasmiden aus Minipräparationen wurde die dreifache, für den Verdau von PCR-Produkten die fünffache Menge der errechneten Unitangabe eingesetzt. Der Ansatz wurde bei 37°C für 1h inkubiert; für PCR-Produkte betrug die Inkubationsdauer 3 bis 5 h. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C für 15 min gestoppt.

2.2.11.2 Ligation

Die Ligation kohäsiver, kompatibler Enden des DNA-Fragments und des Vektors erfolgte mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche, Mannheim). Durch DNA-Ligase wird in einer ATP-anhängigen Reaktion die Bildung von Phosphodiesterbindungen

zwischen 5' Phosphat- und 3'-Hydroxylende katalysiert. Um eine Religation des geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde dieser zuvor mit der Shrimp-alkaline-Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Der Dephosphorylierungsansatz wurde gemäß Tabelle 2-15 angesetzt.

Tabelle 2-15: Dephosphorylierungsansatz

Volumen	Komponente
x µl	Vektor DNA
1 µl	Dephosphorylierungs-Puffer (10x)
1 µl	SAP
ad y µl	Aqua dest (Endvolumen 10 µl)

Um den Erfolg der Dephosphorylierung des Plasmids vor der Ligation zu bestätigen, wurde eine Kontrolltransformation (Durchführung der Transformation unter 2.2.13.1 erklärt) durchgeführt. Wenn die Kolonienzahl der transformierten Zellen der erwarteten Kolonienzahl in Tabelle 2-16 entspricht, kann ein späteres Scheitern der Ligation nicht an der Qualität des eingesetzten Plasmids liegen, sondern höchstens an dessen Konzentration, damit ist eine zielsichere Fehleranalyse gewährleistet. Der Dephosphorylierungsansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend 20 min bei 65°C deaktiviert.

Tabelle 2-16: Kontrolltransformation

Plasmid	Dephosphorelyierung	Ligation	erwartete Kolonienzahl
1-geschnitten	-	-	niedrig ¹
2-geschnitten	+	-	niedrig
3-geschnitten	-	+	viele Kolonien ²
4-geschnitten	+	+	niedrig

¹ weniger als 20 Kolonien; ² mehr als 200 Kolonien

Der nachfolgende Ligationsansatz wurde gemäß Tabelle 2-17 angesetzt.

Tabelle 2-17: Ligationsansatz

Volumen	Komponente
x µl	Vektor DNA (Dephosphorylierungsansatz) (50 ng)
y µl	Insert-DNA (100 ng)

Fortsetzung Tabelle 2-17	
10 μ l	DNA-Ligation-Puffer (2x)
	gut mischen
1 μ l	T4 Ligase
	gut mischen

Es wurde ein molares Verhältnis zwischen Vektor und Insert von 1:3 gewählt, wobei die Gesamtmenge an DNA im Ansatz 150 ng betrug. Der Ligationsansatz wurde 10 min bei RT inkubiert. Für die anschließende Transformation in CaCl_2 -kompetente Zellen wurde der gesamte Ligationsansatz zu 200 μ l Zellen gegeben.

2.2.12 Präparationen von Plasmiden

2.2.12.1 Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lysis

Das Prinzip der alkalischen Lysis beruht darauf, dass bei einem stark alkalischen pH die genomische DNA vollständig denaturiert, indem sich die Einzelstränge weit voneinander entfernen. Die Plasmid-DNA zeichnet sich durch ihre supercoiled-Konformation aus, so dass bei einem alkalischen pH die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen zwar aufgebrochen werden, aber die DNA-Einzelstränge in räumlicher Nähe zueinander bleiben. Bei einer anschließenden Neutralisation können die Plasmid-DNA-Stränge korrekt renaturieren, während die genomischen DNA-Einzelstränge nicht komplementär zum Doppelstrang hybridisieren und bei einer Zentrifugation als Pellet entfernt werden. Für die Präparation von „low copy“-Plasmiden wie pBR322 wurde die Kopienzahl erhöht, indem nach dem Erreichen einer OD_{560} 0,5 Chloramphenicol (20 μ g/ml) zur Kultur zugegeben wurde [59].

2.2.12.2 Plasmid-Minipräparation mittels Silikagel-Säulen

3-5 ml ÜN-Kultur werden 10 min bei 4000 x g in Falcon-Röhrchen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250 μ l Puffer P1 + RNAse (20 mg/ml) resuspendiert, wodurch ein Aufbruch der Zellen erzielt wurde. Es wurden 250 μ l alkalischer Puffer P2 zugesetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig durch invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 350 μ l eisgekühlten Neutralisationspuffer P3 wurde die genomische DNA gefällt und bei der anschließenden 10 min Zentrifugation bei 13000 Upm sedimentiert.

Die Extraktion der Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte mittels einer QIAquick Spin-Säule™ (QIAGEN, Hilden) wie bereits unter (2.2.9.1) beschrieben mit folgender Modifikation: Der Plasmid-haltige Überstand wurde auf die Säule pipettiert und für 60 s bei 13000 Upm abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl PB-Puffer auf die Säule appliziert. Das Waschen der Säule und die Elution der Plasmid-DNA erfolgten wieder gemäß (2.2.9.1).

2.2.12.3 Plasmid-Minipräparation modifiziert nach BIRNBOIM und DOILY

Zur Überprüfung von Plasmid-DNA nach einer Transformation wurde eine nach Birnboim & Dolly (1979) [16] modifizierte Präparation vorgenommen. Wie in der vorangehenden Methode wird die Suspension bis zum Puffer P3 entsprechend behandelt. Der Plasmid-haltige Überstand wurde mit 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) ausgeschüttelt. An der Phasengrenze findet die Proteindenaturierung statt. Die Phasen wurden durch 10min Zentrifugation bei 13.000 Upm entmischt und die wässrige obere Phase weiter verwendet.

Zur Fällung der DNA wurde der Ansatz mit 1 Vol. eiskalten absoluten Ethanol versetzt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 20.000 x g wurde der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet mit 2 Volumen 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 20.000 x g wurde das DNA-Pellet im Vakuum getrocknet und in 30 µl TE-Puffer, versetzt mit RNase (20 µg/ml), resuspendiert. Die Lagerung von isolierter Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

2.2.12.4 Plasmid-Midipräparation

Je nach Kopienzahl des Plasmids wurde ein unterschiedliches Kulturvolumen beimpft. Im Falle eines „low copy“-Vektors wurden 100 ml Kultur angeimpft. Die Zellernte erfolgte bei 4000 x g und 4°C für 10 min. Das Zellpellet wurde in 4 ml P1-Puffer, der mit RNase (100 µg/ml) versetzt war, resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml des alkalischen P2-Puffers wurden die Zellen für maximal 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Zur Neutralisation wurden 4 ml eiskalten P3-Puffer zugegeben, der Ansatz sorgfältig gemischt und 15min auf Eis gelagert. Durch zwei

Zentrifugationsschritte bei 15.000 x *g* und 4°C für 30 min bzw. 15 min wurde ein klarer Überstand gewonnen.

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte durch Bindung an ein Anionen-Austauscher-Harz mit positiv-geladenen DEAE-Gruppen (Qiagen-tip 100 Säule, QIAGEN, Hilden). Die Säule wurde zunächst mit 4 ml QBT-Puffer konditioniert. Der klare Überstand wurde auf die Säule pipettiert, die anschließend zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen wurde. Die Elution der DNA erfolgte mit 5 ml QF-Puffer. Das Eluat wurde anschließend mit 3,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und durch Zentrifugation für 30 min bei 15.000 x *g* und 4°C sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 2 ml 70%igen Ethanol gewaschen und wiederum für 10 min bei 15.000 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, das DNA-Pellet bei 37°C für 30 min getrocknet und in 1 mM Tris-Cl (pH 8,5) resuspendiert.

2.2.13 Herstellung Kompetenter Bakterien und Transformation

2.2.13.1 Herstellung kompetenter Bakterien nach der CaCl₂-Methode

Bei der Transformation wird freie DNA aus der Umgebung der Bakterienzelle aufgenommen. Um isolierte DNA mittels Transformation in die Zellen einzubringen, gibt es mehrere experimentelle Möglichkeiten. Eine Möglichkeit besteht darin, die DNA-Aufnahmebereitschaft der Zellen (Kompetenz) durch eine Vorbehandlung mit bivalenten Kationen und Aufbewahrung in Kälte zu erhöhen. Zur Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂-Methode [29] wurde eine Übernachtskultur 1:200 in 25 ml No.1-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₅₄₆ von 0,4 geschüttelt. 20 ml Bakteriensuspension wurden 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend 5min bei 4.000 x *g* und 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,5 Volumen (10 ml) eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml eiskalter 0,1 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 24 h bei 4°C gelagert.

2.2.13.2 Transformation nach der Methode von HANAHAN

Zellen, die mit CaCl_2 kompetent gemacht wurden (2.2.13.1), werden nach 24 h Lagerung im Kühlschrank für die Transformation eingesetzt. Die Transformation wurde in eisgekühlten 1,5 ml Reagiergefäßen durchgeführt.

Für die Transformation nach Hanahan [70] wurden 100 μl kompetente Zellen mit 50 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt. Es folgte eine 30 min Inkubation auf Eis, in der sich DNA an die Cytoplasmamembran anlagert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 sec bei 42°C inkubiert. Der Hitzeschock verursacht eine erhöhte Fluidität der Membran, wodurch die Aufnahme der DNA in die Zelle erleichtert wird. Die Zellen wurden 5 min auf Eis abgekühlt und 1h in 900 μl vorgewärmten LB-Medium bei 37°C im Rollinkubator inkubiert. In dieser Regenerationsphase kommt es zur Ausprägung der Plasmid-vermittelten Antibiotika-Resistenzen. Anschließend wurden 100 μl Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden nicht transformierte kompetente Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert.

2.2.13.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Eine ÜN-Kultur wurde 1:250 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD_{546} von 0,5 bis 0,6 geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 15 min auf Eis gelagert und in zwei Fraktionen zu je 250 ml 12 min bei $4.000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurde das Zellpellet im Restüberstand resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde dann mit 1 Volumen (250 ml) eiskaltem sterilen H_2O versetzt und 12 min bei $4.000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert (1. Waschung). Nach Abdekantieren des Überstandes und vorsichtiger Resuspension im Restüberstand wurden 0,5 Volumen eiskaltes 10% Glycerin zugegeben und 12 min bei $4.000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert (2. Waschung). Das Zellpellet wurde nun in 15 ml eiskaltem 10% Glycerin vorsichtig resuspendiert und 12 min bei $4.000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert (3. Waschung). Im Restüberstand (400-500 μl) wurde das Pellet nun vorsichtig resuspendiert und zu 50 μl in vorgekühlten Reaktionsgefäßen aliquotiert. Die Reaktionsgefäße wurden dann in -70°C Methanol schockgefroren und die elektrokompetenten Zellen bei -80°C gelagert.

2.2.13.4 Elektroporation

DNA-Transformation durch Elektroporation [47] stellt eine weitere sehr effiziente Methode zur Einschleusung von fremder DNA in die Zelle dar. Dazu wird ein Ansatz mit entsalzter DNA und elektrokompenten Zellen kurzzeitig einer hohen elektrischen Spannung von 2 kV ausgesetzt. Elektrische Felder induzieren in der Membran eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle, so dass innerhalb des elektrischen Impulses DNA ins Zellinnere diffundieren kann.

50 µl elektrokompente Zellen (2.2.13.3) wurden auf Eis aufgetaut, 10 ng entsalztes Plasmid-DNA zupipettiert, vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette pipettiert und mit dem Gene-Pulser (Biorad, München) ein elektrisches Feld von 2,5 kV bei einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω angelegt. Unmittelbar nach dem elektrischen Impuls (Zeitkonstante: 4-5 ms) wurde die Küvette mit 900 µl vorgewärmtem LB-Medium gespült, die Bakteriensuspension in ein Reagenzglas überführt und 1 h bei 37°C im Schüttler regeneriert. Je 100 µl Zellen wurden auf Selektionsplatten ausplattiert. Um die Überlebensrate der Bakterien nach dem elektrischen Impuls zu bestimmen, wurde eine entsprechende Verdünnungsstufe der elektrotransformierten Bakterien auf eine Platte ohne Selektionsantibiotikum ausplattiert. Als Positivkontrolle für die Elektroporation wurde ein zirkulärer Vektor in die Zellen eingeschleust.

2.2.14 Konjugation

Der Transfer von Plasmiden mittels Konjugation wurde insbesondere bei *E. coli* Stamm C600SN (enthält das Helferplasmid RP1H), mit den pBP507-Konstrukten (Abb. 3-12) durchgeführt. Zunächst wurden Vertiefungen von 96-well Mikrotiterplatten mit jeweils 100 µl Standard-Nährbouillon No. 1 gefüllt. Während die für die Rezipienten vorgesehenen Vertiefungen ohne Antibiotikumzusatz belassen wurden, wurden den Ansätzen für die Donorstämme geeignete Antibiotika zur Selektion plasmidhaltiger Zellen zugesetzt. Das Auftragsschema wurde so gewählt, dass zwischen der Auftragsspalte mit Zellen des Rezipienten und denen des mit dem zu konjugierenden Plasmid transformierten Donors eine Spalte frei bleibt, die nur mit Standard-Nährbouillon No. 1 gefüllt ist. Nachdem Donor und Rezipienten ausreichend gewachsen waren, wurden jeweils 5 µl Rezipient und 5-10 µl Donor in der mittleren Spalte mit 100 µl Bouillon gemischt und ÜN bei 37°C inkubiert. Zur

Selektion möglicher Transkonjuganden wurden 50 μl auf eine Selektionsplatte überimpft.

2.2.15 Sequenzierung

Die Methode zur DNA-Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977) [153]. Bei der heute verwendeten Variante wird der zu sequenzierende DNA-Abschnitt *in vitro* durch eine PCR-Reaktion, das Cycle Sequencing, vervielfältigt. Neben dem DNA-Template, der DNA-Polymerase, einem geeigneten Primer und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) enthält der PCR-Ansatz als zusätzliche Komponenten 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs). Aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am C3-Atom, sind diese nicht in der Lage eine Phosphodiesterbindung auszubilden, so dass ihr Einbau zum Kettenabbruch führt. Da dieser Syntheseabbruch statistisch auftritt, kommt es zur Bildung von DNA-Fragmenten aller möglichen Kettenlängen mit definiertem 5' Ende.

Die DNA-Fragmente werden durch Kapillarelektrophorese mit dem automatischen DNA-Sequenzer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt. Da die ddNTPs mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann die Cycle-Sequencing Reaktion in einem einzigen Ansatz durchgeführt werden, mit Hilfe eines Lasers werden die Fragmente mit den unterschiedlichen Enden detektiert. Aus der Abfolge der auftretenden basenspezifischen Farbsignale ergibt sich die Basensequenz der untersuchten DNA-Probe. Die Umsetzung der Farbsignale in die Basenabfolge erfolgt mit Hilfe eines Rechners und entsprechender Software (ABI-CE1, Version 3.0, Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA).

Folgender Reaktionsansatz wurde für das Cycle Sequencing eingesetzt:

Tabelle 2-18: Reaktionsansatz für das Cycle Sequencing

Volumen	Komponente
4 μl	Ready Reaction Mix
x μl	DNA-Template: 20-100 ng (PCR-Fragmente) 1-1,5 μg (Plasmide)
1 μl	Primer (10 pmol/ μl)
1 μl	DMSO (optional)
ad 20 μl	aqua dest

Tabelle 2-19: Temperaturprofil:

Denaturierung:	96°C	2 min	
Denaturierung:	96°C	10 s	25x
Anlagerung:	45-60°C	5 s	
Verlängerung:	60°C	4 min	

Zur Aufreinigung der Proben wurde eine Ethanol-Acetat Fällung durchgeführt. Zu jedem Ansatz wurden 80 µl H₂O, 10 µl 3 M Na-Acetat, pH 4,8 und 250 µl 100% Ethanol gegeben. Darauf folgte eine erste 30-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g und Raumtemperatur. Das Pellet wurde mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min, 20.000 x g), der Überstand vorsichtig mittels Vakuumpumpe abgesaugt und danach vor Licht geschützt bei 37°C getrocknet. Vor dem Auftragen auf die Kapillare wurden die getrockneten Proben in 20 µl Template Suppression Reagent (TSR) aufgenommen und bei 90°C 2min denaturiert.

2.2.16 Bestimmung der spezifischen Luciferase-Aktivität

2.2.16.1 Ansatz in Reagenzglasröhrchen

Die Messungen der Luciferase-Aktivität erfolgten mit dem „Luciferase Assay System“ der Firma Promega in dem Luminometer Luci2 (Fa. Anthos).

Aus ÜN-Kulturen mit Bakterien, die die konstruierten Reporterplasmide (3.1, 3.7 und 3.14.1) enthalten, wurden 2 ml Standard No.1-Nährbouillon in Reagenzglasröhrchen 1:200 beimpft und bei 37 C° und 130 Upm bis zu einer OD_{546nm} zwischen 0,3 und 0,8 (mittlere exponentielle Phase) geschüttelt. Die OD_{546nm} wurde mit dem Photometer der Firma Cary gemessen. Sobald die Proben die gewünschte OD erreicht haben, wurden sie auf Eis gestellt. Für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde von jeder Probe 90 µl entnommen, dazu wurden 10 µl Puffer [1 M K₂HPO₄ (pH 7,8), 20 mM EDTA] gegeben und die Probe wurde danach direkt bei -80 C° eingefroren. Für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde zu den aufgetauten 100 µl Proben jeweils 300 µl frisch präparierter Lyse-Mix, enthält 200 µl CCLR und 100 µl Lysozym (5 mg/ml) und BSA (5 mg/ml), gegeben. Das Einfrieren, und die Zugabe des Puffers, sowie des Lysozyms führen einerseits zur Permeabilisierung der Zellen, so dass

Luciferin in die Zellen eindringen kann. Andererseits stabilisiert der zugegebene Puffer die Stabilität der Luciferase für mehrere Stunden [69].

Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde aus den Proben ein bestimmtes Volumen (1,25 oder 2,5 μl) entnommen und zu 25 μl „Luciferase Assay Reagent“ (Volumen variiert nach dem eingesetzten Probe Volumen) in spezielle, für luminometrische Messungen geeignete Mikrotiterplatten (weiß) pipettiert. Luciferin wird von der Luciferase in der Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und O_2 abgebaut und es entsteht unter anderem Licht.



Anschließend wurde die Mikrotiterplatte in das Luminometer Lucy2 positioniert und die Lichtintensität bei 560_{nm} mit Hilfe des Softwareprogramms Lucysoft (Version 1.6) gemessen.

2.2.16.2 Ansatz in Mikrotiterplattenformat

Die ersten Arbeitsschritte bis zur Bestimmung der OD entsprechen denen unter 2.2.16.1. Die Bestimmung der OD wurde in der Mikrotiterplatte durchgeführt. Die dafür verwendeten Mikrotiterplatten unterscheiden sich von solchen, die für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität verwendet werden (Tabelle 2-11). Für die OD-Bestimmung wurden 100 μl Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte im Lucy2 Luminometer bei 595_{nm}. Die Bestimmung der Luciferase Aktivität erfolgte wie in 2.2.16.1 erklärt, allerdings erfolgte die Messung direkt und ohne Einfrieren der Zellen.

2.2.17 Berechnung des Qsc-Werts

Für die Untersuchung der Superspiralisierung in den Bakterienzellen wurden die in dieser Arbeit hergestellten Reportergenplasmide (3.1, 3.8 und 3.13) einzeln in Bakterienzellen transformiert.

Die spezifische Aktivität wurde als RLU-Wert (Relative Light Units) bezogen auf die optische Dichte (OD) der jeweiligen Probe ermittelt. Der errechnete Wert entspricht der spezifischen Aktivität des jeweiligen Promotors unter den Versuchsbedingungen.

Die Veränderung des Superspiralisierungsgrades wird mit Hilfe des Reportersystems durch Veränderung des Superspiralisierungsquotienten (Qsc) ermittelt.

$$Q_{sc} = \frac{\text{Spezifische Aktivität von } \mathit{ptopA-luc}}{\text{Spezifische Aktivität von } \mathit{pgyrA-luc}}$$

2.2.18 Wirkung von Reinsubstanzen und Extrakten auf den Qsc

Aus Bakterien, die vorher mit den Reporterplasmiden pPHB90 / pPHB91, pPHB92 / pPHB93 oder pPHB94 / pPHB95 transformiert worden sind, wurde eine ÜN-Kultur angesetzt. Nach 15 Stunden wurden daraus 20 µl zu 2 ml Standard No.1-Nährbouillon in ein Reagenzglas gegeben (1:200 Verdünnung). Die Bakterien wurden bei 37°C und 130 Upm bis zu einer OD_{546nm} von etwa 0,06 bis 0,08 geschüttelt. Bei Erreichen dieser OD_{546nm} wurden die jeweiligen Konzentrationen der zu untersuchenden Reinsubstanzen oder Extrakte zu den wachsenden Kulturen gegeben. Anschließend wurden die Bakterien unter den gleichen Bedingungen 60 min bis OD_{546nm} 0,4-0,6 weiter inkubiert. Die Bestimmung der Luciferase Aktivität erfolgte wie unter Punkt 2.2.16 erklärt.

2.2.19 Nachweis der lebenden Bakterienzellen mittels MTT-Reagenz

Bei diesem Test handelt es sich um den Chrom Biodip[®] Antibiotika-Test der Firma Merck, Darmstadt. Der Test wurde zur Detektion von Antibiotika auf DC-Platten entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Test so modifiziert, dass damit lebende Bakterien im Nährmedium nachgewiesen werden könnten. Mit dem Test werden lebende Zellen durch eine Farbreaktion mit dem MTT-Reagenz [Thiazolblau = 3-(4,5 Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] nachgewiesen.

Das Substrat MTT dringt in die Zellen ein und wird durch Aufbrechen des Tetrazoliumringes durch die Dehydrogenasen lebender Bakterien in ein Formazanprodukt umgesetzt, das mit bloßem Auge durch die blaue Färbung der Bakteriensuspension verfolgt werden kann

Die Konzentration dieses Formazanprodukts kann photometrisch bestimmt werden. Die photometrische Bestimmung des blauen Farbprodukts dient zum einen als Test für die Cytotoxizität der zu testenden Substanzen und zum anderen als Hinweis auf

Veränderungen der Anzahl lebender Bakterien. Bereits Leenen *et al.* konnten nachweisen, dass die Abnahme der CFUs (Colony forming units), nach Zugabe von bakteriziden Substanzen, äquivalent zur Abnahme des Formazanproduktes bzw. der Blaufärbung ist [106]

Für den Test wurden 6,25 µl MTT-Reagenz aus einer Stammlösung [4 mg/ml] zu 100 µl Bakterienzellen, die sich in der log Phase befinden, eingesetzt (Endkonzentration = 25 µg/ml). Die blaue Färbung trat nach 20 min auf. Als Negativkontrolle wurden zum verwendeten Medium (Standard No.1-Nährbouillon) die gleichen Mengen an MTT-Reagenz gegeben.

2.2.20 Anzüchten des Novobiocin-Produzenten *Streptomyces caeruleus*

Aus einer Sporensuspension von *Streptomyces caeruleus* wurden 50 µl CDM-Medium (50 ml) über 4-5 Tage bei 28°C und 170 Upm angezogen. Aus der gewachsenen *Streptomyces caeruleus* Kultur wurden 50 µl entnommen und erneut in 50 ml CDM-Medium pipettiert und unter den gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Zur Gewinnung von Novobiocin wurde die Kultur bei Raumtemperatur bei 4300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Tests eingesetzt.

Für die Bestimmung der Novobiocinkonzentration im gewonnenen Überstand wurde ein Agardiffusionstest, wie in 2.2.20 erklärt, durchgeführt. Der ausplattierte Stamm war DE112. Es wurden allerdings keine Filterblättchen auf den Agar gelegt, sondern es wurden Löcher mit verschiedenen Durchmessern (4, 9 und 1,7 mm) mit Hilfe eines Korkbohrers gestanzt. In die Löcher wurden verschiedene Mengen des Novobiocin enthaltenden Überstands von *Streptomyces caeruleus* pipettiert. Die Agarplatten wurden bei 37°C im Brutschrank für 18 h bebrütet. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der gebildeten Hemmhofdurchmesser.

2.2.21 Herstellung der zu testenden Extrakte

Pilze oder Pflanzenteile wurden zerkleinert und in Erlenmeyerkolben mit Ether für 3 h bei 150 Upm geschüttelt. Um die Effektivität der Extraktion zu steigern, wurden 3 Murmeln mit in die Kolben gegeben. Anschließend wurden die Extrakte abfiltriert. Durch den Zusatz von Natriumsulfat wurde das im Extrakt eventuell vorhandene

Wasser entfernt, da Natriumsulfat Wasser bindet und sich in Form von „Klumpen“ absetzt, die anschließend abfiltriert werden.

Um das Volumen einzuengen und dadurch die Konzentration der Inhaltstoffe in den Extrakten zu erhöhen, wurde das Volumen der Extrakte in einem Rotationsdampfer eingeeengt.

2.2.22 Agardiffusionstest auf Agarplatten

Mit Hilfe des Agardiffusionstests lassen sich Extrakte oder Substanzen auf eine mögliche antibakterielle Aktivität testen.

Aus einer ÜN-Kultur wurde ein McFarland 0,5 (KBE = 10^8 /ml) hergestellt und mit sterilem Wattestäbchen auf eine Agarplatte in drei Richtungen vertikal, horizontal und diagonal ausplattiert, bis die Agaroberfläche mit der Bakteriensuspension vollständig bedeckt ist. Nach Abtrocknen der Agaroberfläche wurden Filterblättchen in die zu testenden Extrakte eingetaucht und auf den Agar gelegt. Als Kontrolle wurden „Fertigblättchen“ mit Gemifloxacin 5 µg/ml (Becton Dickenson; Sensi-Disc; SBQ5) mitgeführt. Die Agarplatten wurden bei 37°C im Brutschrank für 18 h bebrütet. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung des gebildeten Hemmhofdurchmessers.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung eines funktionsfähigen *luc*-Reportergenkonstrukts in das Vektorplasmid pBR322

Das Plasmid pBR322 ist eines der am häufigsten verwendeten Klonierungsvektoren in *E. coli*. Es liegt mit einer Kopiezahl von 15-20 Kopien pro Zelle vor [152], ist 4361 bp groß und trägt drei relevante funktionelle Bereiche: das Tetracyclinresistenz-Gen *tetA* (C) des natürlich vorkommenden *Salmonella* Plasmids pSC101, das Ampicillinresistenz-Gen *bla* des Transposons Tn3, das für die β -Laktamase TEM-1 codiert, und die Replikationsregion mit flankierenden Sequenzen des *E. coli* Plasmids pMB1, das in dieselbe Kompatibilitätsgruppe wie das Plasmid ColE1 fällt. pBR322 fehlen zwar die Mobilisierungsgene, doch sind die sogenannte *bom* Sequenz (basis of mobility), eine Erkennungsstelle für Mobilisierungsproteine, und die *nic* Sequenz, an der ein Einzelstrangsnitt vor dem Transfer des DNA-Einzelstranges für die Mobilisierung erfolgt, noch vorhanden. Für die Insertion von Reportergenkonstrukten wurde das Plasmid zunächst nach Standardbedingungen (2.2.11.1) mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I an der einzigen Schnittstelle bei Position 3612 bp gespalten und damit linearisiert. Anschließend wurde das Plasmid gemäß 2.2.9 gereinigt und für die nachfolgenden Klonierungsschritte bei -20°C aufbewahrt.

Um das Gen *luc*, das für die Luciferase von *Photinus pyralis* codiert, als Reportergen mit Promotorbereichen fusionieren zu können, wurde es zunächst aus dem Plasmid pGEM[®]-*luc* (Promega) nach Amplifikation so isoliert, dass im gewünschten Abstand eine Fusion mit einem zu untersuchenden Promotorfragment möglich war. Hierfür wurde in Vorarbeiten im Rahmen der Diplomarbeit die SOEing-Technik angewandt [2]. Da dem eukaryontischen Gen *luc* eine in *E. coli*-Zellen funktionelle Shine-Dalgarno-Sequenz fehlt, sollte die Expression von *luc* in *E. coli* vollständig der Kontrolle des jeweiligen davor liegenden Promotors erfolgen. Nach Amplifikation der Promotorbereiche *ptopA* und *pgyrA* aus chromosomaler DNA von *E. coli* und Insertion direkt am 5'-Ende des *luc*-Gens (Abbildung 2-1) ergaben sich die gewünschten *ptopA-luc* und *pgyrA-luc*-Fragmente. Wegen der leichteren Handhabbarkeit wurden diese zunächst über Restriktionsschnittstellen, die mit Hilfe der PCR-Primer GYRA5-1, TOPA5-1 und LUC3-1 eingeführt worden waren, in den Vektor pGEM5zf(+) eingesetzt. Die entstandenen Plasmide wurden pGEM5zf(+)-T21

und pGEM5zf(+)-G62 genannt. Die pGEM5zf(+) Konstrukte haben sich allerdings nach mehreren Versuchen aufgrund von großen Schwankungen bei den Messungen nicht für einen Einsatz als Testsystem qualifiziert [2]. Grund dafür ist vermutlich die sehr hohe Kopiezahl dieser Vektoren (300-400 Kopien pro Zelle). Für die weitere Entwicklung des Testsystems wurden nur Vektorplasmide mit niedriger Kopiezahl eingesetzt.

Als Template für das Fusionskonstrukt *ptopA-luc* diente das Plasmid pGEM5zf(+)-T21, aus dem es mit den Primern TOPA5-1 und LUC3-3 (2.2.6) amplifiziert wurde. Für das Fusionskonstrukt *pgyrA-luc* wurde das Plasmid pGEM5zf(+)-G62 als Vorlage verwendet und in einer PCR mit den Primern GYRA5-1 und LUC3-3 (Abbildung 2-1) amplifiziert. In die Übergangsbereiche der Primer GYRA5-1, TOPA5-1 und LUC3-3 waren Erkennungsstellen für *PstI* bei der Synthese eingebaut worden. Nach Spaltung der beiden Fusionskonstrukte mit *PstI* wurden diese Fusionskonstrukte mit dem linearisierten *PstI*-gespaltenen Vektorplasmid pBR322 ligiert (2.2.11.2). Nach der Ligation wurde der Bakterienstamm DH5 α mit den Ansätzen gemäß 2.2.13.2 transformiert. Da die einzige *PstI* Restriktionsschnittstelle in dem für Ampicillinresistenz codierenden Bereich des Plasmids liegt, verlieren Zellen, die das rekombinante Fragment (*ptopA-luc* oder *pgyrA-luc*) im Plasmid tragen, die Eigenschaft zur Ampicillinresistenz. Entsprechende Klone, die nur auf Chinablau-Laktose-Agarplatten mit 10 μ g/ml Tetracyclin wuchsen, wurden anschließend weiter charakterisiert. Aus solchen Klonen wurden die Plasmide mittels DNA-Minipräparation (2.2.12.2) isoliert und anschließend mit *EcoRI* gespalten. Durch die Restriktionsspaltung mit *EcoRI* konnte zum einen die Anwesenheit des *luc*-Gens nachgewiesen und zum anderen die Orientierung des Fusionkonstrukts im Plasmid bestimmt werden. Diese Art des Nachweises ist möglich, da pBR322 nur eine *EcoRI* Restriktionsschnittstelle besitzt und sich eine zweite – asymmetrisch - im *luc*-Gen befindet, was durch die Existenz von zwei unterschiedlichen Bandenmustern nach Restriktionsspaltung der rekombinanten Plasmide mit *EcoRI* bestätigt wurde. Durch die unterschiedlichen Größen der erhaltenen Banden konnten Rückschlüsse auf die Orientierung gezogen werden. Die Orientierung des jeweiligen Reporter-genpromotors, *ptopA* bzw. *pgyrA*, in Relation zur Orientierung des *pbla* Promotors und damit die Leserichtung der jeweiligen Transkripte könnte Einfluss auf das Ausmaß der superspiralisierungsabhängigen *luc*-Genexpression haben: Bei

entgegengesetzter Ausrichtung (**Abb. 3-1**) sollte sich eine mögliche Hintergrundaktivität des Vektorpromotors *pbla* vermeiden lassen.

Als Referenz-Stamm für die Untersuchungen mit den pBR322-Konstrukten, pPHB90 (pBR322-*ptopA-luc*) und pPHB91 (pBR322-*pgyrA-luc*) wurde *E. coli* WT verwendet.

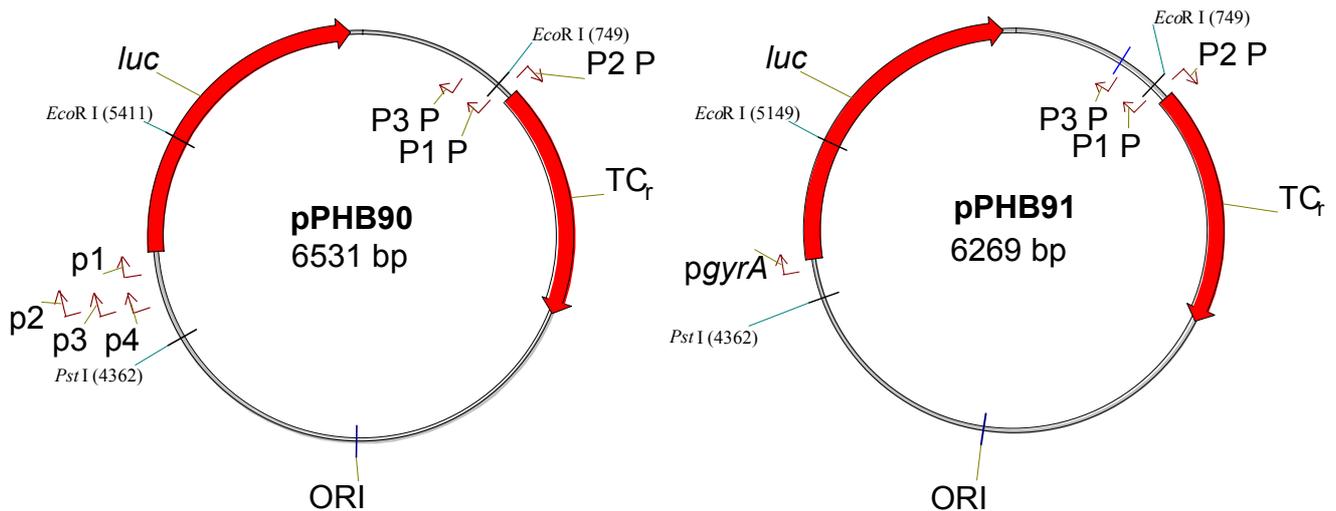


Abb. 3-1: Reporterplasmide pPHB90 und pPHB91

3.2 Charakterisierung der Reporterplasmide

Die hergestellten Konstrukte wurden durch drei Methoden charakterisiert:

i) Restriktionsverdau:

Nach einem Restriktionsverdau, wie unter 3.1 erwähnt, wurden die gespaltenen Konstrukte gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.8) und durch Größenvergleich der erhaltenen Banden die Existenz und Orientierung der eingefügten rekombinanten Fragmente nachgewiesen.

ii) Luciferase-Aktivität:

Die Klone, welche die gewünschten Konstrukte enthielten, wurden auf die Fähigkeit zur Luciferase-Expression geprüft (2.2.16). Die Messungen erfolgten im Luminometer durch die Bestimmung der RLUs (relative light units). Dieser Test diente dem Ausschluss von funktionsunfähigen Reporterprodukten, die möglicherweise aufgrund von Punktmutationen durch Ungenauigkeiten bei der PCR entstanden sein können.

iii) DNA-Sequenzanalyse:

Die klonierten Fragmente einschließlich des Übergangsbereichs zwischen Promotor (*topA* oder *gyrA*) und Reporter gen (*luc*) sowie die Übergangsbereiche vom Fragment in die flankierenden Bereiche des Klonierungsvektors wurden mittels spezifischer Primer sequenziert (2.2.15). Hierdurch konnten mögliche Mutationen, die im Laufe der PCR-Amplifikation zufällig entstanden sein könnten, in einzelnen Klonen detektiert und die durch Restriktionsspaltung ermittelte Orientierung bestätigt werden.

3.3 Optimierung der Messbedingungen mit dem Reporter gensystem

3.3.1 Bedingungen zur Messung der „relative light units“ (RLU)

Die Aufarbeitung von Kulturen, deren Zellen ein Reporter genplasmid enthielten, erfolgte zunächst nach einem Protokoll der Firma Promega und ist unter 2.2.16 beschrieben. Im Hinblick auf die Durchführung der Tests in Mikrotiterplatten und eine später mögliche Automatisierung des Systems stellt das nach dem Promega-Protokoll geforderte Einfrieren der Proben jedoch ein Hindernis dar. Es wurden daher verschiedene Durchführungsvarianten sowohl mit als auch ohne Einfrieren sowie unter Weglassen einzelner Komponenten hinsichtlich der maximal zu erzielenden RLU-Werte getestet. In **Tabelle 3-1** sind die Ergebnisse der Messungen unter den verschiedenen getesteten Bedingungen aufgeführt. Fehlende Komponenten wie z. B. Lysozym, oder Puffer in den Ansätzen 2-7 wurden durch das entsprechende Volumen an destilliertem Wasser ersetzt. Die als Standardmethode verwendete Probenbearbeitung (Ansatz 1) mit Cell Culture Lysis Reagent[®] (CCLR) von Promega, Lysozym und einem unter 2.2.16 beschriebenen Puffer lieferte ebenso wie Ansätze ohne Puffer (Ansatz 2) oder Lysozym (Ansatz 5) unabhängig vom Einfrieren nahezu identische RLU-Werte. Die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse wurden aus einer RLU-Bestimmung mit dem *E. coli* Bakterienstamm WT mit dem Reporter genplasmid pBP322-*ptopA-luc* erhalten (**Tab. 3-1**).

Tabelle 3-1: Vergleich der RLU-Werte unter verschiedenen Testbedingungen

Ansatz	Testbedingungen				RLU	
	Probe ^a	Lysozym ^b	CCLR ^c	Puffer ^d	mit Einfrieren	ohne Einfrieren
1 (Standard)	+	+	+	+	1029	993
2	+	+	+	-	1013	1041
3	+	-	+	-	998	1017
4	+	+	-	-	824	307
5	+	-	+	+	1040	1003
6	+	+	-	+	870	523
7	+	-	-	-	657	890

^a 90 µl; ^b 100 µl (5 mg/ml); ^c 200 µl; ^d 10 µl. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Experimenten

3.3.2 Linearität des Messbereichs

Um die Aktivitätsbestimmung der Luciferaseexpression innerhalb eines großen Messbereichs genau durchführen zu können, muss in diesem Bereich eine lineare Korrelation zwischen der Aktivität und der Substratmenge bestehen. Hierfür wurden die Bedingungen für die enzymatische Reaktion optimiert. So sind entsprechend der in den Zellen vorhandenen Luciferase-Konzentration z.B. auch ATP und das Substrat Luciferin in bestimmten Mengen erforderlich. Diese Bedingungen wurden über die optimale Menge an Luciferase Assay Reagent (LAR) bestimmt, indem zunächst bei jeder Messung ermittelt wurde, in welchem Volumenbereich die Proben eine lineare Korrelation zwischen der eingesetzten Probenmenge (als Äquivalent für die Luciferase-Konzentration) und der Menge an LAR zeigten. Hierdurch konnte die LAR-Menge gegenüber der vom Hersteller (Promega) empfohlenen 100 µl deutlich auf 25 µl reduziert werden.

In **Abbildung 3-2** sind die Ergebnisse der Luciferase-Bestimmung nach Einsatz von verschiedenen Probenvolumina (0,625 bis 20 µl) und verschiedenen LAR-Mengen (25, 50 bzw. 100 µl) dargestellt. Die aufgeführten Ergebnisse wurden aus einer RLU-Bestimmung mit dem *E. coli* Bakterienstamm WT mit dem Reporter-genplasmid pPHB90 erhalten. Das Konstrukt mit dem *topA*-Promotor wurde verwendet, da dieser ohne Zugabe von Gyrase-Inhibitoren deutlich höhere RLU-Werte als pPHB91 lieferte (**Tabellen 3-3 und 3-4**).

Bei LAR-Mengen zwischen 25 und 100 µl verdoppelten sich die RLU-Werte mit der Verdopplung der eingesetzten Probenvolumina von 0,065 bis 5 µl. Bei größeren

Probenvolumina wurde eine Verdopplung der Werte nur in den Proben mit 100 μl LAR beobachtet.

Alle RLU-Bestimmungen in dieser Arbeit wurden daher mit Probenvolumina von 1,25 und 2,5 μl durchgeführt. Dadurch war gewährleistet, dass auch mit 25 μl LAR ausreichend Substrat vorhanden ist, ohne die Reaktion zu beeinträchtigen. Bei Proben, die größere Werte als 3.000 RLU ergaben, wurde die eingesetzte LAR-Menge auf 100 μl erhöht.

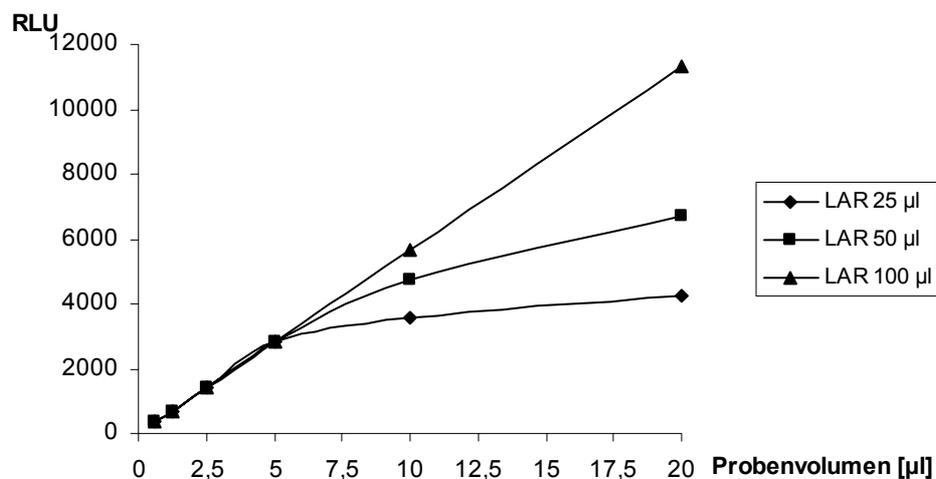


Abb. 3-2: Zunahme der RLU-Werte in Abhängigkeit von LAR-Menge und Volumen der Probe

3.3.3 Ermittlung der spezifischen Luciferase-Aktivität

Die spezifische Luciferase-Aktivität wurde ermittelt, um Schwankungen der RLU-Werte, hervorgerufen vor allem durch unterschiedliche Bakterienzahlen, auszuschließen. Hierzu wurden die mit dem Luminometer gemessenen absoluten Luciferase-Aktivitäten bezogen auf:

- a- Proteinmenge in der Probe
- b- Zellzahl
- c- Trübungsmessung (OD_{546})

Die spezifische Aktivität wurde als RLU-Wert bezogen auf die optische Dichte (OD) der jeweiligen Probe ermittelt. Mit diesem Bezug der RLU-Werte auf die optische

Dichte wurde die beste Reproduzierbarkeit und eine schnellere Messung erreicht. Die Trübungsmessung bei OD_{546nm} wurde unmittelbar vor der Entnahme der zu messenden Probe vollzogen. Für die Messung wurden Bakterienzellen verwendet, die sich in der mittleren exponentiellen Phase (OD_{546nm} 0,3 - 0,6) befanden. In diesem OD-Bereich bestand eine lineare Korrelation zwischen OD_{546nm} und gemessenen RLU-Werten (**Abbildung 3-3**). In der stationären Wachstumsphase ($OD_{546nm} > 0,8$) war das Verhältnis von optischer Dichte und RLU-Werten nicht mehr linear. Die eingetragenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils drei Versuchen. Die Werte der Standardabweichung für die einzelnen Messpunkte liegen unter 1%.

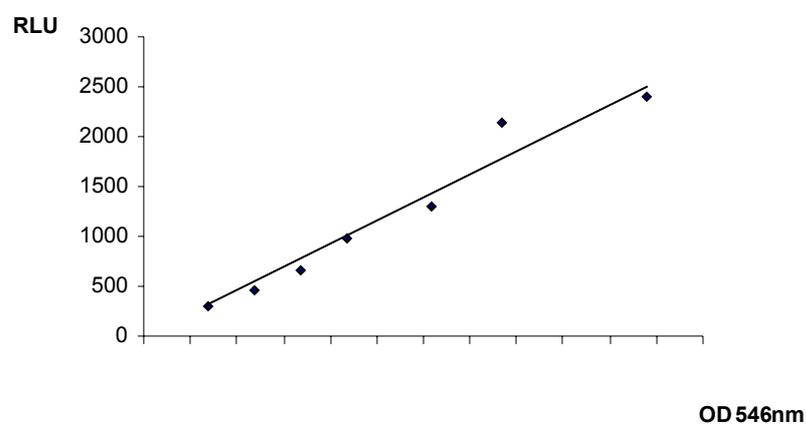


Abb. 3-3: Zunahme der RLU-Werte in Abhängigkeit von OD (Mittelwerte aus drei Messungen)

3.3.4 Stabilität des Lichtsignals

Die Stabilität des Enzyms Luciferase bleibt in Anwesenheit der verwendeten Puffer für mindestens drei Stunden erhalten. In diesem Zeitraum lieferten die Proben identische RLU-Werte unabhängig davon, ob die Messung nach 10 min oder drei Stunden erfolgte. Demgegenüber nahm die Intensität des gebildeten Lichts (RLU-Werte) nach Zugabe des Substrats Luciferin, enthalten in LAR, kontinuierlich ab (**Abbildung 3-4**). Die Messungen wurden mit den beiden WT-Stämmen durchgeführt, die das jeweilige pBR322-Konstrukt (Abb. 3-1) enthielten. Die prozentuale Abnahme der RLU Werte in den beiden Proben war bei allen Zeitpunkten (1, 2.5, 5, 10 und 20 min) gleich und betrug nach 20 min 67%. Für die

Berechnung und Vergleichbarkeit von Qsc-Werten (Aktivität *ptopA* / Aktivität *pgyrA*) ist der gleiche prozentuale Verbrauch von Luciferin in den beiden Proben mit den Reportergenplasmiden pPHB90 und pPHB91 ein wichtiges Kriterium.

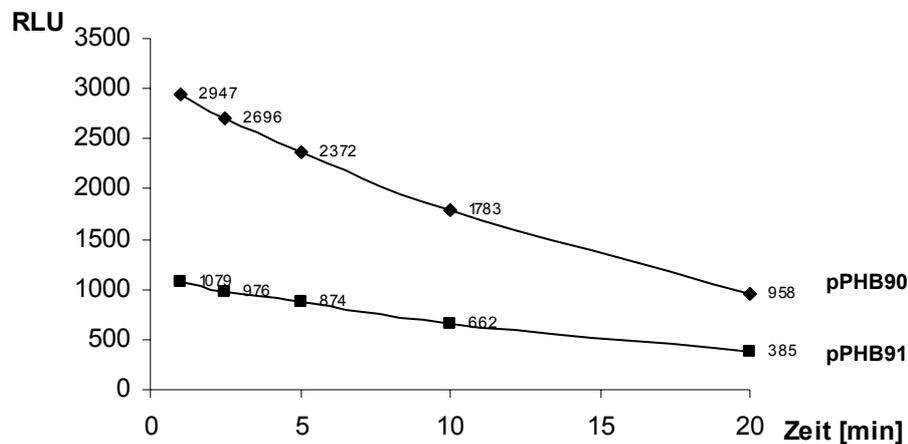


Abb. 3-4 Abnahme der RLU-Werte mit der Zeit

3.4 Spezifität und Validität des Reportergensystems

Nach der Optimierung der Messmethoden wurde untersucht, ob das auf pBR322 basierende Reportergensystem auf Veränderungen im DNA-Superspiralisierungsgrad anspricht. Dafür wurde Luciferaseexpression unter folgenden Bedingungen untersucht:

- Analyse von Mutanten, deren DNA-Superspiralisierungsgrad durch Mutationen in Gyrase und Topoisomerase I nachgewiesenermaßen verändert ist,
- Analyse nach Hemmung von Gyrase durch spezifische Inhibitoren,
- Analyse unter verschiedenen Umweltbedingungen.

3.4.1 Auswirkung von Mutationen in *gyrA* und *topA* auf die Superspiralisierung

Veränderungen in den Enzymaktivitäten von Topoisomerase I und Gyrase aufgrund bestimmter Mutationen in den korrespondierenden Genen führen zu Veränderungen der Superspiralisierung in den jeweiligen Bakterienstämmen. Dieses wurde an

speziellen Mutanten mittels elektrophoretischer Auftrennung isolierter Plasmid-DNA nachgewiesen [7]. Mit Hilfe des konstruierten Reportergensystems sollten sich solche Unterschiede in der Superspiralisierung nunmehr *in vivo* bestätigen lassen.

Hierzu wurde der globale Überspiralisierungsgrad als Qsc-Wert für die *E. coli* K12 Stämme JTT1, KD112 und RS2 bestimmt. Der Stamm JTT1 ist der Ausgangsstamm für die beiden isogenen Mutanten, die sich voneinander lediglich durch Mutationen in *topA* (RS2) und *gyrB* (KD112) unterscheiden. Das hat zur Folge, dass RS2 eine erhöhte negative Superspiralisierung aufgrund einer Mutation in *topA*, dem Gen für die Topoisomerase I, besitzt. KD112 dagegen zeigt als Folge einer Mutation in der B-Untereinheit der Gyrase eine verminderte Superspiralisierung. KD112 besitzt jedoch neben der *gyrB*-Mutation (*gyrB226*) noch eine chromosomal codierte Tetracyclin-Resistenzeigenschaft, so dass die Superspiralisierung dieser Mutante nicht mit den pBR322-Reportergenplasmiden (nur Tetracyclin als Selektionsmarker) bestimmt werden konnte. Anstelle von KD112 wurde deswegen die *gyrA*-Doppelmutante WT-3-1 (**Tabelle 3-2**) mit dem auf pBR322 basierenden Reporter-testsystem untersucht. Der ermittelte Qsc-Wert von WT-3-1 war um 21% niedriger als der von WT. Die Erhöhung der Superspiralisierung der Mutante RS2 zeigte sich durch eine Erhöhung des Qsc-Wertes um 198% gegenüber JTT1.

Die mit den Reportergenplasmiden ermittelten Unterschiede in der Superspiralisierung zwischen JTT1 und RS2 waren mittels elektrophoretischer Auftrennung auf einem Chloroquin-haltigen Agarose-Gel [7] nachgewiesen worden. **Abbildung 3-5** zeigt das Gelphoto aus dieser Arbeit. Aufgetragen ist das Plasmid pBR322, das aus den drei Stämmen isoliert wurde, sowie relaxiertes pBR322 als Kontrolle (rel). Das Laufverhalten der aufgetragenen DNA (pBR322) auf dem Gel zeigt in einem bestimmten Bereich eine Korrelation mit dem Grad der Superspiralisierung. Auf dem Gelphoto ist der Unterschied im Laufverhalten von pBR322 aus KD112 und RS2 deutlich. Aufgrund der höheren negativen Superspiralisierung und damit der höheren Kompaktheit der aus RS2 isolierten pBR322-Topoisomere stieg die Wanderungsgeschwindigkeit an verglichen mit der von DNA aus JTT1 und KD112. Entsprechend war die Laufstrecke der pBR322-Topoisomere aus KD112 wegen der Relaxierung kürzer als die von DNA aus JTT1.

Tabelle 3-2: Einfluss von Topoisomerase I- und Gyrase Mutationen auf die Superspiralisierung

Stamm ¹	Qsc ²	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
pPHB90 / pPHB91			
JTT1	2,67	100	8,9
KD112 (<i>gyrB226</i>)	-	-	-
RS2 (<i>topA10</i>)	5,29	198	4,9
WT	1,32	100	5,3
WT-3-1(<i>gyrA</i> ^{S83L,D87G})	0,93	79	10,7

¹) pPHB90 = pBR322-*ptopA-luc* / pPHB91 = pBR322-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten;

³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

⁴) S = Standardabweichung.

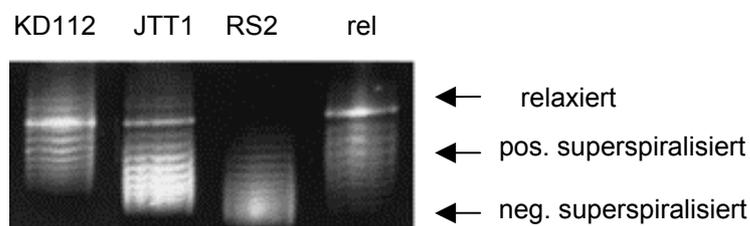


Abb. 3-5: Bestimmung der Superspiralisierung von pBR322-Topoisomeren isoliert aus JTT1, KD112 und RS2 in einem Chloroquin (5 µg/ml) haltigen Agarose-Gel (1,8%) [Bagel, et al.,1999]

3.4.2 Einfluss von bekannten Gyrase-Inhibitoren auf den Qsc-Wert

Chinolone und Aminocumarine sind die klinisch genutzten Antibiotika-Klassen, deren Vertreter eine inhibitorische Wirkung auf DNA-Gyrase besitzen, jedoch mit unterschiedlichen Bereichen des Enzyms interagieren. Durch Testung von Vertretern beider Klassen, wie unter 2.2.16 erklärt, sollte geprüft werden, ob das Reportergensystem geeignet ist, die Hemmwirkung von Substanzen auf Gyrase durch Messung einer Veränderung des Superspiralisierungsgrades *in vivo* nachzuweisen.

3.4.2.1 GyrA-Inhibitoren

Chinolone, insbesondere die fluorierten Derivate, Fluorchinolone, sind Inhibitoren der A-Untereinheit der DNA-Gyrase. Die Auswirkungen einer Hemmung von Gyrase durch diese Substanzen auf die Superspiralisierung der DNA wurden mit dem Reportergensystem auf transkriptionaler Ebene untersucht. Dabei wurden die nach

der Zugabe der Hemmstoffe veränderten Promotor-Aktivitäten von *ptopA* und *pgyrA* bestimmt und daraus der Qsc-Wert berechnet. Die eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen entsprachen 0,5 bis 2 x MHK. Um die Veränderung der Qsc-Werte in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration besser verfolgen und nachvollziehen zu können, sind neben den Qsc-Werten die gemessenen spezifischen Werte der Promotor-Aktivitäten angegeben.

Mit dem Reportersystem konnte in Zellen von *E. coli* WT nach Zugabe von 0,25 µg/ml (2 x MHK) des Fluorchinolons Moxifloxacin eine deutliche Abnahme des Qsc-Wertes auf 71% gezeigt werden (**Tabelle 3-3**). Mit Nalidixinsäure war nach gleicher Zeit (60 min) ebenfalls eine Abnahme der DNA-Superspiralisierung in JTT1 auf 41% feststellbar. Bei beiden Antibiotika war diese Abnahme konzentrationsabhängig. Die Zugabe von Moxifloxacin verursachte eine Abnahme der Aktivitäten beider Promotoren, wobei die Reduktion der *ptopA*-Aktivität stärker ausfiel. Nalidixinsäure hatte ebenfalls eine Herabsetzung der *ptopA*-Aktivität zur Folge, veränderte jedoch kaum die *pgyrA*-Aktivität nach Zugabe von 2 und 4 µg/ml. Nach der Zugabe von 8 µg/ml (2 x MHK) nahm die Aktivität von *pgyrA* zu, während die *ptopA*-Aktivität weiter abnahm.

Tabelle 3-3: Wirkung von GyrA-Inhibitoren auf den Qsc-Wert

Stamm	GyrA-Inhibitor [µg/ml]	spez. Aktivitäten <i>ptopA</i> / <i>pgyrA</i> pPHB90 / pPHB91 ¹	Qsc ²	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
WT	-	773 / 585	1,32	100	5,3
WT	Moxi ⁵ 0,125	576 / 478	1,21	92	9,1
WT	Moxi 0,25	370 / 382	0,97	71	8,2
JTT1	-	2223 / 807	2,76	100	8,3
JTT1	Nal ⁶ 2	1890 / 834	2,27	82	6,3
JTT1	Nal 4	1635 / 812	2,01	73	2,4
JTT1	Nal 8	1129 / 1013	1,12	41	4,5

¹) pPHB90 = pBR322-*ptopA-luc* / pPHB91 = pBR322-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegebenen sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten

³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

⁴) S = Standardabweichung.

⁵) Moxi (Moxifloxacin) MHK WT = 0,125 µg/ml; ⁶) Nal (Nalidixinsäure) MHK JTT1 = 4 µg/ml

3.4.2.2 GyrB-Inhibitoren

Die Aktivität der *ptopA*- und *pgyrA*-Promotoren wurde nach der Zugabe von Inhibitoren, die an der GyrB-Untereinheit angreifen, für das pPHB90/pPHB91 Reportergensystem untersucht und jeweils der Qsc-Wert berechnet.

Es wurde sowohl in WT als auch in JTT1 eine deutliche und konzentrationsabhängige Abnahme der Aktivitäten von *ptopA* und *pgyrA* beobachtet (**Tabelle 3-4**), wobei die Reduktion der *ptopA* Aktivität deutlich stärker ausfiel, bei WT von 773 auf 134 (18% des Ausgangswertes), als die Abnahme von *pgyrA* (46%). So nahm der Qsc-Wert in WT durch die Zugabe von 32 µg/ml Novobiocin (0,25 x MHK) auf 38% ab. Der *E. coli* Stamm JTT1 zeigte nach der Zugabe von Novobiocin (25 µg/ml, entsprechend 1/4 x MHK) eine Qsc-Abnahme auf 56%, die mit der Erhöhung der Novobiocin-Konzentration auf 200 µg/ml weiter bis auf 28% abnahm. Analog zu den Ergebnissen mit WT war die Senkung der *ptopA* Aktivität bei JTT1 wesentlich höher bei *pgyrA*.

Tabelle 3-4: Wirkung von GyrB-Inhibitoren auf den Qsc-Wert

Stamm	GyrB-Inhibitor [µg/ml]	spez. Aktivitäten <i>ptopA</i> / <i>pgyrA</i> pPHB90 / pPHB91 ¹	Qsc ²	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
WT	-	773 / 585	1,32	100	5,3
WT	Novo ⁵ 16	433 / 514	0,84	64	4,8
WT	Novo 32	134 / 270	0,50	38	8,0
JTT1	-	2223 / 807	2,76	100	8,3
JTT1	Novo ⁶ 25	1256 / 809	1,55	56	0,5
JTT1	Novo 50	1026 / 723	1,42	51	0,7
JTT1	Novo 100	777 / 671	1,16	42	5,2
JTT1	Novo 200	437 / 568	0,77	28	0,8

¹) pPHB90 = pBR322-*ptopA-luc* / pPHB91 = pBR322-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegebenen sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten

³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

⁴) S = Standardabweichung.

^{5,6}) Novo (Novobiocin) MHK für WT und JTT1 = 128 µg/ml

3.4.2.3 Einfluss von Gyrase Inhibitoren auf die Mutante WT-3-1 (*gyrA*^{S83L,D87G})

Veränderung der Superspiralisierung in einem Wildtyp (WT) und in einer daraus hergestellten Fluorchinolonresistenten *gyrA*-Doppelmutante (WT-3-1) wurde nach

Zugabe von Inhibitoren für GyrA- bzw GyrB mit den Reporterplasmiden pPHB90 und pPHB91 verfolgt.

WT-3-1 war hergestellt worden, indem eine *gyrA*-Doppelmutation (S83L und D87G) durch In-vitro-Mutagenese in WT eingeführt wurde [6]. Die Doppelmutation bewirkt einen Anstieg der MHK für Ciprofloxacin (Inhibitor von GyrA) von 0,03 µg/ml für WT auf 0,25 µg/ml für WT-3-1. In WT, wo Gyrase die primäre Zielstruktur für Chinolone darstellt, verminderte sich der Qsc-Wert infolge der Inkubation mit Ciprofloxacin (MHK) für WT um 26%, während bei entsprechender Behandlung WT-3-1, mit Topoisomerase IV als primärer Zielstruktur, nur eine Reduktion des Qsc-Werts von 2% verursachte (**Tabelle 3-5**). Der Einsatz des GyrB-Inhibitors Novobiocin (1/4 x MHK) zeigte in beiden Stämmen eine starke Abnahme des Qsc-Wertes von 48% (WT-3-1) und 66% (WT).

Tabelle 3-5: Einfluss von Gyrase Inhibitoren auf WT3-1 (*gyrA*^{S83L,D87G})

Stamm	GyrA-Inhibitor [µg/ml]	GyrB-Inhibitor [µg/ml]	Qsc ² pPHB90 / pPHB91 ¹	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
WT	-	-	1,32	100	5,3
WT	Cipro ⁵ 0,03	-	0,98	74	4,1
WT	-	Novo ⁶ 32	0,45	34	8,8
WT-3-1	-	-	0,93	100	10,7
WT-3-1	Cipro ⁵ 0,25	-	0,89	98	7,8
WT-3-1	-	Novo ⁶ 32	0,48	52	12,5

¹) pPHB90 = pBR322-*ptopA-luc* / pPHB91 = pBR322-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegebenen sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴) S = Standardabweichung; ⁵) Cipro (Ciprofloxacin) MHK WT = 0.03 µg/ml; WT3-1 = 0.25 µg/ml; ⁶) Novo (Novobiocin) MHK für WT und WT-3-1 = 128 µg/ml

3.4.3 Effekt von Ampicillin (Negativkontrolle)

Als Negativ-Kontrolle wurde der Einfluss eines Antibiotikums getestet, das definitiv keine Wirkung auf die bakteriellen Topoisomerasen besitzt. Hierzu wurde das Antibiotikum Ampicillin eingesetzt, das in die Zellwandsynthese der Bakterien eingreift und dadurch bakterizid wirkt. **Tabelle 3-6** zeigt die Wirkung von 4 µg/ml Ampicillin (1 x MHK) auf den Qsc in WT. Die gemessene Veränderung der Qsc-Werte betrug lediglich 1%.

Tabelle 3-6: Wirkung von Ampicillin auf die Superspiralisierung

Stamm	Ampicillin [µg/ml]	Qsc ² pPHB90 / pPHB91 ¹	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
WT	-	1,32	100	5,3
WT	4	1,33	101	4,8

¹) pPHB90 = pBR322-*ptopA-luc* / pPHB91 = pBR322-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegebenen sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten. ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴) S = Standardabweichung.

3.4.5 Einfluss variierender Inkubationsbedingungen auf den Qsc

Die Superspiralisierung von *E. coli* WT wurde unter gleichen Inkubationsbedingungen in drei verschiedenen Nährmedien untersucht, um den Einfluss eines unterschiedlichen Nährstoffgehalts auf die Superspiralisierung zu testen. Bei den verwendeten Nährmedien handelt es sich um zwei Vollmedien, Standard Nährbouillon No.1 und LB- (Luria Bertani) Bouillon sowie ein Minimalmedium (M9) mit Glucose- Zusatz (Tabelle 2-5). Als Minimalmedium wird ein synthetisches Nährmedium bezeichnet, das nur die für das Wachstum des betreffenden Organismus unbedingt notwendigen Nährstoffe enthält, während in einem Vollmedium dagegen noch weitere Verbindungen, die nicht unbedingt lebensnotwendig sind, das Wachstum jedoch fördern, enthalten sind [11].

Die als Maß für die Superspiralisierung der DNA in den Zellen von *E. coli* WT errechneten Qsc-Werte zeigten (**Tabelle 3-7**), dass WT in beiden Vollmedien eine ähnliche Superspiralisierung aufwies. Im Minimalmedium wurde hingegen ein deutlich geringerer Qsc-Wert gemessen.

Da das M9 Minimalmedium neben dem geringeren Nährstoffgehalt eine mehr als doppelt so hohe Osmolarität im Vergleich zu den zwei Vollmedien aufweist, wurde ein weiterer Versuch (3.4.5.2) in einem Vollmedium (LB) durchgeführt, um den alleinigen Effekt der Osmolarität auf die Superspiralisierung zu untersuchen.

Tabelle 3-7: Einfluss verschiedener Nährmedien auf den Qsc in WT

Medium	Qsc ¹	S [%] ²
Standard Nr.1	1,32	5,3
LB	1,39	1,4
M9 (+Glu)	0,89	6,7

¹)Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegebenen sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten

²) S = Standardabweichung.

3.4.5.2 Osmolarität

Um die Wirkung niedriger bzw. hoher Osmolarität auf die Superspiralisierung der Bakterienzellen zu prüfen, wurden vier LB-Medien mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (**Tabelle 3-8**) hergestellt. Das Standard LB-Medium wird mit einer NaCl-Konzentration von 0,17 bis 0,3 M hergestellt und weist dann eine Molarität von 365 mOsm/kg auf. Die Qsc-Werte, die für Zellen von WT mit dem aus pBR322 hergestellten Reportergensystem bestimmt wurden, zeigten bei Abwesenheit von NaCl eine deutlich geringere Superspiralisierung. Die höchste Konzentration (0,6 M) hatte im Vergleich zu Standard NaCl-Konzentrationen eine Erhöhung des Qsc-Wertes zur Folge. Bei einer höheren NaCl-Konzentration (>0,6 M) wurde das Wachstum der Bakterien allerdings vollständig gehemmt.

Tabelle 3-8: Einfluss der NaCl-Konzentration auf den Qsc in *E. coli* WT

LB + NaCl (M)	Qsc ¹	S [%] ²
LB (ohne NaCl)	0,88	2,3
LB+0,17 M	1,39	1,4
LB+0,3 M	1,36	9,6
LB+0,6M	2,76	4,7

¹)Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegebenen sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten

²) S = Standardabweichung.

3.4.5.3 Wachstumsphase

Die Superspiralisierung der DNA in *E. coli* JTT1 wurde von der frühen exponentiellen Phase ($OD_{546nm} = 0,06$) bis zur stationären Phase einer Batchkultur durch die Bestimmung der Qsc-Werte mittels des auf pBR322 basierenden Reportergensystems verfolgt. Die Ergebnisse in **Tabelle 3-9** zeigen eine stabile Superspiralisierung während der exponentiellen Phase (OD_{546nm} von 0,16-0,6). Die Zellzahl-Bestimmung (Daten nicht gezeigt) hatte ergeben, dass für den in diesem Versuch verwendeten *E. coli* JTT1 die stationäre Phase und damit die nicht exponentielle Zellteilung ab einer $OD_{546nm} = 0,9$ beginnt. Während der stationären Phase (ab OD_{546nm} 0,9) wurde eine Reduktion des Qsc-Wertes beobachtet. Diese Abnahme setzte sich im weiteren Verlauf der stationären Phase fort und erreichte einen Qsc-Wert von 0,87.

Tabelle 3-9: Einfluss der Wachstumsphase auf den Qsc in *E. coli* JTT1

	OD ₅₄₆					
	0,06	0,13	0,3	0,6	0,9	1,2
Qsc	2,26	2,45	2,59	2,46	1,74	0,87
S [%]	4,9	5,7	6,6	5,3	4,6	11,5

Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegebenen sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; S = Standardabweichung

Nachdem der Nachweis der Spezifität und Validität des Testsystems durch die Untersuchung sowohl der Superspiralisierung in Mutanten als auch nach Zugabe von Topoisomerase-Hemmstoffen sowie unter verschiedenen Inkubationsbedingungen erfolgt war, schloss sich eine Optimierung der Messbedingungen an, um Möglichkeiten für die Nutzung des Testsystems für den Nachweis potentieller Topoisomerase-Inhibitoren zu prüfen.

3.5 Einfluss von potentiellen Topoisomerase-Inhibitoren

Die mit dem Testsystem auf eine potentielle Hemmwirkung gegen Topoisomerase I oder Gyrase getesteten Substanzen und Extrakte haben entweder antibakterielle Aktivität gezeigt oder besitzen Cumarinderivate, die aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten mit den Aminocumarinen, die als Gyrase-Inhibitoren bekannt sind, eventuell Aktivität gegen die Gyrase zeigen könnten.

3.5.1 Simocyclinon

Die Untersuchung der Wirkung von Simocyclinon D8 auf Topoisomerase I oder Gyrase wurden mit dem auf pBR322 basierenden Reportersystem in *E. coli* WT durchgeführt. Simocyclinon D8, isoliert aus *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 [166], besteht aus zwei Komponenten (**Abbildung 3-6**), eine davon ist ein 3-Amino-4,7-Dihydroxy-Cumarin, das als Grundstruktur in den Antibiotika Novobiocin und Coumermycin A vorkommt.

Zunächst wurde im Konzentrationsbereich zwischen 5 und 20 µg/ml getestet. Alle drei getesteten Konzentrationen (5, 10 und 20 µg/ml) führten zu einer deutlichen Reduktion der Qsc-Werte (**Tabelle 3-10**). Dabei beeinflusste Simocyclinon D8 die Aktivität der *topA*- und *gyrA*-Promotoren unterschiedlich. Während die Aktivität des Topoisomerase I Promotors (*topA*) deutlich um 33% (5 µg/ml) bzw. 49% (10 µg/ml) abnahm, wurde eine Steigerung der Aktivität des *gyrA*-Promotors auf 140% (5 und

10 µg/ml) registriert. Die Zugabe von 20 µg/ml Simocyclinon D8 führte nach entsprechender Zeit zu einer weiteren Reduktion der *topA* Aktivität und ebenfalls zu einer Reduktion der *gyrA*-Aktivität von 12%.

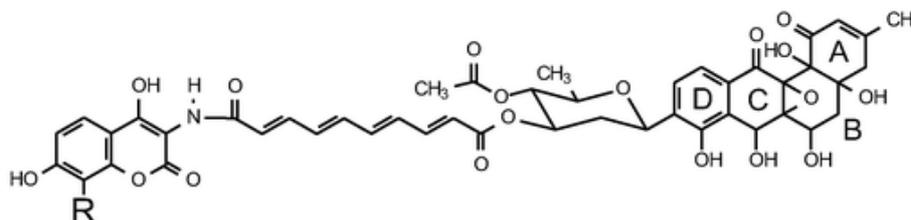


Abb. 3-6 Die Struktur von Simocyclinon D8 (R = Cl)

Tabelle 3-10: Einfluss von Simocyclinon auf den Qsc in *E. coli* WT

	spez. Aktivität RLU/OD ₅₄₆		spez. Aktivität [%]	Qsc ² (±S) ³	Qsc[%] ⁴
Kontrolle	pPHB90 ¹	728	100	1,32(±0,07)	100
	pPHB91 ¹	552	100		
+ 5 µg/ml Simocyclinon	pPHB90	489	67	0,62(±0,04)	50
	pPHB91	793	140		
+10 µg/ml Simocyclinon	pPHB90	371	51	0,47(±0,03)	38
	pPHB91	795	140		
+ 20 µg/ml Simocyclinon	pPHB90	194	27	0,39(±0,04)	31
	pPHB91	499	88		

¹) pPHB90 = pBR322-*ptopA-luc* / pPHB91 = pBR322-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³)S = Standardabweichung.

⁴) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

3.5.2 Rubradirin

Die Wirkung von Rubradirin, einem Ansamycin-ähnlichen Chinon (**Abbildung 3-7**) isoliert aus *Streptomyces achromogenes*, auf Gyrase und Topoisomerase I wurde mit dem aus pBR322 abgeleiteten Testsystem in *E. coli* WT verfolgt. Rubradirin bewirkte eine mäßige, von der Konzentration unabhängige Abnahme des Qsc-Wertes (**Tabelle 3-11**). Diese Reduktion des Qsc-Wertes lag bei den drei getesteten Konzentrationen zwischen 17% (5 µg/ml) und 10% (20 µg/ml). Die *pgyrA*-Aktivität erhöhte sich nach der Zugabe von Rubradirin, wobei die größte Steigerung (23%) durch die niedrigste Konzentration (5 µg/ml) hervorgerufen wurde. Die Veränderung der Aktivität des *topA*-Promotors betrug <5%.

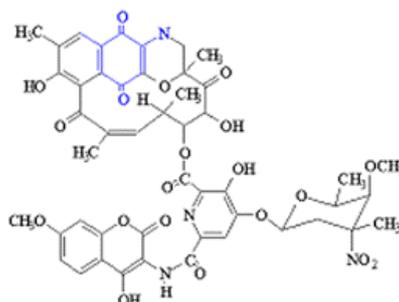


Abb. 3-7: Die Struktur von Rubradirin

Tabelle 3-11: Einfluss von Rubradirin auf den Qsc in *E. coli* WT

	spez. Aktivität RLU/OD ₅₄₆		spez. Aktivität [%]	Qsc ² (±S) ³	Qsc[%] ⁴
Kontrolle	pPHB90 ¹	779	100	1,24(±0,04)	100
	pPHB91 ¹	630	100		
+ 5 µg/ml Rubradirin	pPHB90	785	101	1,01(±0,02)	83
	pPHB91	775	123		
+10 µg/ml Rubradirin	pPHB90	770	99	1,05(±0,04)	86
	pPHB91	730	116		
+20 µg/ml Rubradirin	pPHB90	750	96	1,10(±0,05)	90
	pPHB91	684	109		

¹) pPHB90 = pBR322-*ptopA-luc* / pPHB91 = pBR322-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) S = Standardabweichung.

⁴) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

3.5.3 Helenalin

Helenalin, ein Sesquiterpen isoliert aus *Arnica chamissonis* (**Abbildung 3-8**), wirkt antibakteriell und antimykotisch und weist MHK-Werte zwischen 10- bis 100 µg/ml auf [185, 144]. Helenalin zeigte über den getesteten Konzentrationsbereich (20-80 µg/ml) mit dem aus pBR322 abgeleiteten Testsystem in *E. coli* WT keinen Einfluss auf den Qsc (**Tabelle 3-15**). Die Aktivität beider Promotoren nahm mit steigender Konzentration nahezu parallel ab.

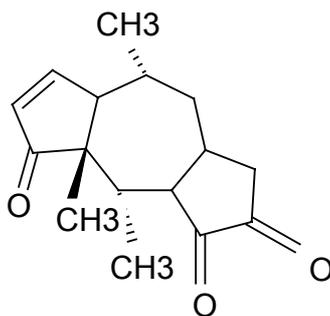


Abb. 3-8 Die Struktur von Helenalin

Tabelle 3-12: Einfluss von Helenalin auf den Qsc-Wert

	spez. Aktivität RLU/OD ₅₄₆	spez. Aktivität [%]	Qsc ² (±S) ³	Qsc[%] ⁴	
Kontrolle	pPHB90 ¹	783	100	1,36(±0,07)	100
	pPHB91 ¹	578	100		
+ 20 µg/ml Helenalin	pPHB90	700	89	1,36(±0,03)	100
	pPHB91	515	89		
+40 µg/ml Helenalin	pPHB90	709	90	1,45(±0,10)	107
	pPHB91	490	85		
+ 80 µg/ml Helenalin	pPHB90	565	72	1,36(±0,10)	100
	pPHB91	416	72		

¹) pPHB90 = pBR322-*ptopA-luc* / pPHB91 = pBR322-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) S = Standardabweichung.

⁴) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

3.6 Einsatz der hyperempfindlichen *E. coli* Mutante DE112

Der als Referenz-Stamm für die Untersuchungen mit den pBR322-Konstrukten pPHB90 und pPHB91 eingesetzte *E. coli* WT zeigte für getestete Antibiotika, wie z. B. Novobiocin, hohe MHK-Werte (132 µg/ml). Mögliche Ursachen sind entweder verringerte Aufnahme oder der Export des vorher aufgenommenen Antibiotikums.

Die Zugabe des Effluxpumpenhemmers Phenylalanyl-Arginyl-β-Naphthylamid (Phe-Arg-β-Naphthylamid) (64 µg/ml) zu WT bei der MHK-Bestimmung reduzierte die MHK für Novobiocin von 132 µg/ml auf 2 µg/ml. In **Tabelle 3-13** sind die Daten einer Qsc-Bestimmung in WT mit und ohne die Zugabe des Effluxpumpeninhibitors aufgeführt. Während die zugegebenen 0,5 µg/ml Novobiocin den Qsc kaum veränderten, war die Abnahme bei der gleichen Novobiocin-Konzentration nach Zugabe von Phe-Arg-β-Naphthylamid auf 44% sehr deutlich.

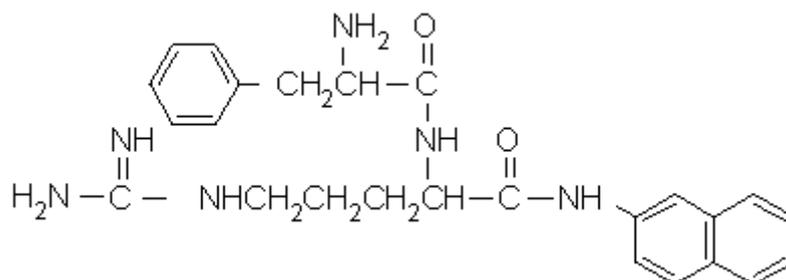
Abb. 3-9: Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid

Tabelle 3-13: Wirkung von Novobiocin mit und ohne Effluxpumpeninhibitor auf den Qsc-Wert

Stamm	Novobiocin [$\mu\text{g/ml}$]	Phe-Arg- β - Naphthylamid	Qsc ²	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
pPHB90 / pPHB91 ¹					
WT	-	-	1,32	100	5,3
WT	0,5 ⁵	-	1,29	98	7,2
WT	-	64 $\mu\text{g/ml}$	1,30	98	6,3
WT	0,5	64 $\mu\text{g/ml}$	0,58	44	5,2

¹) pPHB90 = pBR322-*ptopA-luc* / pPHB91 = pBR322-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴) S = Standardabweichung. ⁵) Novobiocin MHK für WT = 128 $\mu\text{g/ml}$

Um die Empfindlichkeit des Testsystems für Substanzen, die in niedrigen Konzentrationen in zu testenden Extrakten vorkommen und eventuell eine Hemmwirkung auf die Topoisomerase I oder Gyrase haben, aber möglicherweise durch Effluxpumpen des bisher eingesetzten Teststamms WT ausgeschleust werden, zu steigern, wurde die *E. coli toIC*-Mutante DE112 verwendet.

TolC ist als Porin-Komponente für die Funktion von diversen Protonen abhängigen Effluxsystemen erforderlich [128]. Darunter sind Vertreter der RND-„Multidrug“-Familie (resistance-nodulation-cell division) wie AcrAB-TolC, AcrD, AcrEF, MdtEF, MdtABC. [52, 87, 122, 126, 127], sowie die zwei Effluxsysteme EmrAB und EmrKY der MFS-Familie (major facilitator superfamily) und das Effluxsystem MacAB der ABC- (ATP-binding cassette) Transporter [103, 11, 127].

Die *toIC*-Mutation erhöht die Empfindlichkeit der Zellen für ein breites Spektrum von Antibiotika, einschließlich der Fluorchinolone (GyrA-Hemmer) und Aminocumarine (GyrB-Hemmer) [165]. Bei *E. coli* stellt das Effluxsystem AcrAB-TolC das für Antibiotikaresistenz bedeutendste dar [165].

Die *E. coli tolC*-Mutante DE112 besitzt jedoch aufgrund des Tn10 Transposons eine intrinsische Tetracyclinresistenz, so dass der Einsatz der Reporterplasmide pPHB90 und pPHB91, die Tetracyclinresistenz als einzigen Selektionsmarker besitzen (**Abbildung 3-1**), zur Bestimmung des Qsc-Werts in diesem Stamm nicht möglich war. Um Veränderungen des Qsc-Werts dennoch in diesem sensitiven Stamm untersuchen zu können wurde ein zweites Paar von Reporterplasmiden hergestellt (3.7).

3.7 Konstruktion der Reporterplasmide pPHB92 und pPHB93

pACYC177 ist ein Klonierungsvektor, der in niedriger Kopienzahl von etwa 15 Kopien pro *E. coli* Zelle vorkommt [152] und einen origin of replication des Plasmids p15A besitzt. Das 3941 bp große Plasmid pACYC177 trägt neben dem Ampicillinresistenzgen (*bla*^{TEM-1}) das Kanamycinresistenzgen (*aph*(3')-Ia), was eine Selektion in der Tetracyclinresistenten *E. coli tolC*-Mutante DE112 ermöglicht. Das Plasmid wurde außerdem wie pBR322 für die Analyse der Superspiralisierung mittels Chloroquin-Gelen eingesetzt [125].

pACYC177 wurde für die Klonierung wie pBR322 mit *Pst*I gespalten und auf die gleiche Art und Weise für die Ligation mit den *luc*-Fusionskonstrukten eingesetzt (3.1). Die Herstellung der rekombinanten Fragmente *ptopA-luc* und *pgyrA-luc* erfolgte analog der Vorgehensweise, die unter 3.1 erklärt worden ist. Da die einzige *Pst*I-Restriktionsschnittstelle in pACYC177 in dem für Ampicillinresistenz codierenden Bereich des Plasmids liegt, verlieren Zellen, die das rekombinante Fragment (*ptopA-luc* oder *pgyrA-luc*) im Plasmid tragen, die Eigenschaft zur Ampicillinresistenz. Entsprechende Klone, die nur auf Chinablau-Laktose-Agarplatten mit 30 µg/ml Kanamycin wuchsen, wurden anschließend weiter charakterisiert. Die aus diesen Klonen isolierten Plasmide wurden mit der Restriktionsendonuklease *Hinc*II gespalten. Für dieses Enzym besitzt pACYC177 nur eine Schnittstelle, während jeweils eine weitere im *luc*-Gen und in der Promotorsequenz von *topA* existiert. Damit konnte wie bei den pBR322-Konstrukten unter Punkt 3.1 sowohl die Existenz als auch die Orientierung der Fusionskonstrukte in pACYC177 ermittelt werden. Wie bei den pBR322-Konstrukten wurden pACYC177-Konstrukte ausgewählt, bei denen die *gyrA*- und *topA*-Promotoren in die entgegengesetzte Richtung zum *pbla*-Promotor gelesen werden, um mögliche Hintergrundaktivität zu vermeiden. Die so gewählten

Reporterplasmide pPHB92 (pACYC177-*topA-luc*) und pPHB93 (pACYC177-*gyrA-luc*) (**Abb. 3-10**) wurden dann aus dem *E. coli* K12 Stamm DH5 α isoliert und in andere Teststämme transformiert. Die Charakterisierung der beiden Konstrukte erfolgte gemäß 3.2. Die Optimierung der Messbedingungen erfolgte analog der Vorgehensweise, die mit pPHB90 und pPHB91 unter 3.3 erklärt worden ist (Daten nicht gezeigt). Für pPHB92 und pPHB93 waren die gleichen Messbedingungen geeignet.

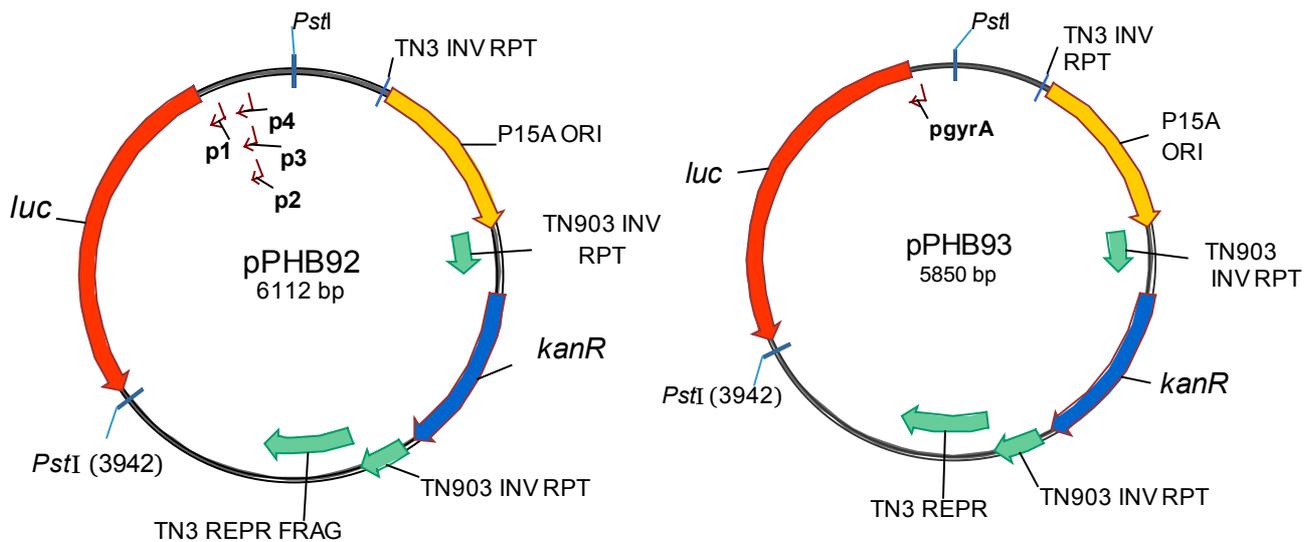


Abb. 3-10: Reporterplasmide pPHB92 und pPHB93

3.8 Spezifität und Validität des pACYC177-Reportergensystems

Die Ansprechbarkeit dieses Reportergensystems auf Veränderungen des Qsc wurde auf die gleiche Art wie beim pBR322-Reportergensystem (3.4) untersucht und nachgewiesen.

3.8.1 Auswirkung von Mutationen in *gyrA* und *topA* auf die Superspiralisierung

Die unterschiedliche chromosomale Superspiralisierung der drei *E. coli* K12 Stämme JTT1, KD112 und RS2 (Beschreibung unter 3.4.1) wurde untersucht. Die Qsc-Werte in **Tabelle 3-14** wurden mit den Reporterplasmiden pPHB92 und pPHB93

ermittelt. KD112 zeigte einen um 73% verringerten Qsc-Wert, während der von RS2 eine Erhöhung von 82% aufwies.

Tabelle 3-14: Einfluss von Topoisomerase I- und Gyrase-Mutationen auf die Superspiralisierung

Stamm	Qsc ²	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
pPHB92 / pPHB93 ¹			
JTT1	4,37	100	3,4
KD112 (<i>gyrB226</i>)	1,16	27	3,4
RS2 (<i>topA10</i>)	7,94	182	8,2

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴) S = Standardabweichung

3.8.2 Einfluss von bekannten Gyrase-Inhibitoren auf den Qsc-Wert

3.8.2.1 GyrA-Inhibitoren

Tests mit den Reporterplasmiden pPHB92 und pPHB93 haben in der hyperempfindlichen *E. coli* Mutante DE112 eine deutliche Reduktion des Qsc-Wertes durch Nalidixinsäure auf 69% und durch Moxifloxacin auf 65% ergeben (**Tabelle 3-15**). Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen jeweils der MHK. Wie bei dem auf pBR322 basierenden Testsystem führte Moxifloxacin zu einer Senkung beider Promotor-Aktivitäten, während Nalidixinsäure eine Abnahme der *ptopA*-Aktivität und eine Zunahme der *pgyrA*-Aktivität verursachte.

Tabelle 3-15: Wirkung von GyrA-Inhibitoren auf den Qsc-Wert

Stamm	GyrA-Inhibitor [µg/ml]	spez. Aktivitäten <i>ptopA</i> / <i>pgyrA</i>	Qsc ²	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
pPHB92 / pPHB93 ¹					
DE112	-	2043 / 567	3,61	100	5,8
DE112	Moxi ⁵ 0,015	1058 / 507	2,25	65	6,2
DE112	Nal ⁶ 0,5	1562 / 660	2,37	69	2,9

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴) S = Standardabweichung

⁵) Moxi (Moxifloxacin) MHK DE112 = 0,015 µg/ml; ⁶) Nal (Nalidixinsäure) MHK DE112 = 0,5 µg/ml

3.8.2.2 GyrB-Inhibitoren

Das auf pACYC177 basierende Testsystem zeigte nach Zugabe von Novobiocin und Coumermycin A eine deutliche Abnahme der Qsc-Werte (**Tabelle 3-16**). Auffällig war jedoch die konzentrationsabhängige Zunahme der *pgyrA*-Aktivität, da für das aus pBR322 hergestellte Reportersystem nach Zugabe von Novobiocin eine Verringerung der Aktivität von *pgyrA* ermittelt wurde (**Tabelle 3-4**). Die Erhöhung der *pgyrA*-Aktivität konnte ebenfalls nach der Zugabe von Coumermycin A gemessen werden.

Tabelle 3-16: Wirkung von GyrB-Inhibitoren auf den Qsc-Wert

Stamm	GyrB-Inhibitor [$\mu\text{g/ml}$]	spez. Aktivitäten <i>ptopA</i> / <i>pgyrA</i>	Qsc ²	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
pPHB92 / pPHB93 ¹					
DE112	-	2043 / 567	3,61	100	5,8
DE112	Novo ⁵ 0,25	1765 / 561	3,14	85	5,7
DE112	Novo 0,5	1544 / 744	2,08	58	5,8
DE112	Novo 1,0	847 / 817	1,04	29	7,8
DE112	Coum ⁶ 2	1212 / 550	2,20	66	6,3
DE112	Coum 4	1062 / 524	2,03	36	1,5
DE112	Coum 8	738 / 644	1,15	32	9,5

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴) S = Standardabweichung

⁵) Novo (Novobiocin) MHK DE112 = 2 $\mu\text{g/ml}$; ⁶) Coum (Coumermycin A) MHK DE112 = 16 $\mu\text{g/ml}$

3.9 Effekt von Ampicillin (Negativkontrolle)

Die Qsc-Bestimmung mit den Plasmiden pPHB92 und pPHB93 ergab nach Zugabe von 4 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin (Begründung der Wahl von Ampicillin unter 3.4.1.5) eine Abnahme von 7% (**Tabelle 3-17**).

Tabelle 3-17: Wirkung von Ampicillin auf die Superspiralisierung

Stamm	Ampicillin [µg/ml]	Qsc ² pPHB92 / pPHB93 ¹	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
DE112	-	3,61	100	5,8
DE112	4	3,35	93	9,8

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴) S = Standardabweichung

3.10 Einsatz des Reportergensystems zum Naturstoffscreening

Das Testsystem sollte nicht nur zur Detektion von inhibitorischen Aktivitäten von Reinsubstanzen gegenüber Topoisomerase I und Gyrase verwendet werden, sondern auch zum Screening solcher inhibitorischen Aktivitäten in Naturstoffextrakten aus Pflanzen, Pilzen oder Bakterien.

Darüber hinaus wurde die Fähigkeit des Testsystems untersucht, Veränderungen in der DNA-Superspiralisierung zu zeigen, die beim Screening nicht aufgrund einer enzymatischen Hemmung der Topoisomerase I oder Gyrase zustande kommen, sondern strukturell bedingt sind, wie z. B. Interkalation in die DNA.

3.10.1 Einfluss von DNA-Interkalatoren (Ethidiumbromid)

Die Folgen der Interkalation von EtBr in die DNA auf die Aktivitäten der Promotoren *ptopA* für Topoisomerase I und *pgyrA* für Gyrase wurden mit diesem Versuch untersucht.

Beide getesteten Konzentrationen hatten eine deutliche Abnahme der Qsc-Werte auf 35% mit 6,25 µg/ml und 12% mit 12,5 µg/ml zur Folge (**Tabelle 3-18**). Die *ptopA*-Aktivität sank mit 6,25 µg/ml EtBr um 62% und die Aktivität wurde bei steigender EtBr-Konzentration (12,5 µg/ml) weiter auf 16% reduziert. Dagegen wurde bei *pgyrA* eine Zunahme der Aktivität gemessen, die bei einer EtBr-Konzentration von 12,5 µg/ml 134% erreichte. Höhere EtBr-Konzentrationen als 12,5 µg/ml führten zur vollständigen Hemmung des Wachstums von DE112.

Tabelle 3-18: Einfluss von Ethidiumbromid (EtBr) auf den Qsc in *E. coli* DE112

	spez. Aktivität RLU/OD ₅₄₆		spez. Aktivität [%]	Qsc ² (±S) ³	Qsc[%] ⁴
	pPHB92 ¹	pPHB93 ¹			
Kontrolle	pPHB92 ¹	1783	100	3,75(±0,10)	100
	pPHB93 ¹	475	100		
+ 6,25 µg/ml EtBr	pPHB92	672	38	1,31(±0,08)	35
	pPHB93	514	108		
+12,5 µg/ml EtBr	pPHB92	280	16	0,44(±0,16)	12
	pPHB93	638	134		

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) S = Standardabweichung; ⁴) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

3.10.2 Kulturüberstand von *Streptomyces caeruleus*

Als positive Kontrolle für einen Einsatz im Naturstoffscreening wurde die Wirkung des Kulturüberstands des Novobiocin-Produzenten *Streptomyces caeruleus* (früher *Streptomyces sphaeroides*) getestet. Nachdem die Kultur angezüchtet worden war (2.2.20), wurde die wirksame Novobiocinaktivität im Kulturüberstand in einem Agardiffusionstest mit DE112 ermittelt (2.2.22) und mittels MHK-Bestimmung in einer Mikrotiterplatte (2.2.3) überprüft. Sie betrug 62,5 µg/ml. Der Einfluss des Kulturüberstands von *Streptomyces caeruleus* auf die Superspiralisierung wurde in DE112 mit dem Reportersystem pPHB92/pPHB93 getestet. Die Zugabe von 25 µl Überstand in 2 ml Ansatz, entsprechend einer Endkonzentration von 0,75 µg/ml Novobiocin, reduzierte den Qsc-Wert um 18% (**Tabelle 3-19**). Die doppelte Menge an Überstand (50 µl) hatte eine weitere Senkung des Qsc-Wertes um insgesamt 21% zur Folge.

Tabelle 3-19: Einfluss des *Streptomyces caeruleus*-Überstands auf den Qsc-Wert in DE112

	spez. Aktivität RLU/OD ₅₄₆		spez. Aktivität [%]	Qsc ² (± S) ³	Qsc[%] ⁴
	pPHB92 ¹	pPHB93 ¹			
Kontrolle	pPHB92 ¹	1707	100	3,65 (±0,10)	100
	pPHB93 ¹	467	100		
+ 25µl Überstand	pPHB92	1486	87	3,01 (±0,20)	82
	pPHB93	483	103		
+ 50µl Überstand	pPHB92	1384	81	2,89 (±0,16)	79
	pPHB93	479	103		

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) S = Standardabweichung; ⁴) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

3.10.3 Herniarin und Xanthotoxin

Xanthotoxin (**Abb. 3-11**) ist ein Furanocumarin. Es kommt in oberirdischen Teilen von *Ruta graveolens* (Rautenkraut) und Wurzeln von *Angelica archangelica* ssp. *Litoralis* (Angelika-Wurzel) vor. Herniarin (**Abb. 3-12**) ist ein Hydroxycumarin und ebenfalls in Rautenkraut enthalten. Beide Substanzen weisen eine Cumarin-Grundstruktur auf. Die Wirkung beider Substanzen auf den DNA-Superspiralisierungsgrad wurde mit dem auf pACYC177 basierenden Reportersystem in der Mutante DE112 getestet. Beide Substanzen reduzierten konzentrationsabhängig den Qsc-Wert (**Tabelle 3-20**), wobei der stärkere Effekt durch Xanthotoxin verursacht wurde. So war der Qsc-Wert bei 100 µg/ml stärker reduziert als bei 50 µg/ml und betrug für Herniarin bei 100 µg/ml 70%, für Xanthotoxin jedoch nur 12% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Antwort der Promotoren *ptopA* und *pgyrA* auf die Zugabe beider Substanzen war unterschiedlich: Während die Aktivität des *ptopA*-Promotors in beiden Fällen abnahm, wurde die Aktivität des *pgyrA*-Promotors besonders nach der Zugabe von Xanthotoxin stark erhöht.

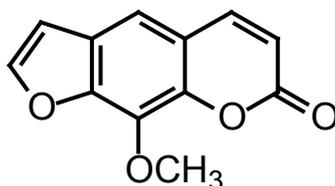


Abbildung 3-11: Xanthotoxin (8-Methoxypsoralen)

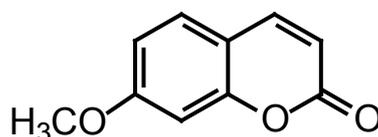


Abbildung 3-12: Herniarin

Tabelle 3-20: Einfluss von Herniarin und Xanthotoxin auf den Qsc in *E. coli* DE112

	spez. Aktivität RLU/OD ₅₄₆		spez. Aktivität [%]	Qsc ² (±S) ³	Qsc[%] ⁴
Kontrolle	pPHB92 ¹	1749	100	3,65(±0,10)	100
	pPHB93 ¹	447	100		
Herniarin [µg/ml]					
50	pPHB92	1340	77	2,96(±0,01)	81
	pPHB93	452	101		
100	pPHB92	1282	73	2,54(±0,25)	70
	pPHB93	504	113		
Xanthotoxin [µg/ml]					
50	pPHB92	736	44	0,86(±0,09)	24
	pPHB93	884	198		
100	pPHB92	464	27	0,44(±0,04)	12
	pPHB93	1052	235		

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) S = Standardabweichung; ⁴) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

3.10.4 Screening von pflanzlichen Extrakten auf Wirkung gegen Gyrase und Topoisomerase I

Alle untersuchten Pflanzen-Extrakte waren Ether-Extrakte (zur Herstellung der Extrakte siehe 2.2.21). Ether allein hatte bis zu einer Konzentration von 1,5% (30 µl im 2 ml Probenansatz) keinen Effekt auf die Promotor Aktivitäten von *topA* und *gyrA* (Daten nicht gezeigt). Zu den Versuchsansätzen wurden jeweils maximal 20 µl Ether-Extrakt gegeben. Die Durchführung der Versuche ist unter 2.2.16 erläutert.

3.10.4.1 Angelikawurzel-Extrakt

Die Zugabe von 2,5 µl des Wurzelextrakts von *Angelica archangelica* ssp. *Litoralis* (Angelika-Wurzel) reduzierte den Qsc-Wert auf 58% (**Tabelle 3-21**), wobei die Abnahme ausschließlich auf eine Verringerung der *topA*-Promotor Aktivität zurückzuführen war. Nach der Zugabe von 5 µl Extrakt nahm der Qsc im Vergleich zum Kontrollwert weiter auf 42% ab. Bei dieser Extraktmenge war neben der *topA*-auch die *gyrA*-Aktivität reduziert.

10 µl Angelikawurzel-Extrakt hatte eine sehr starke Reduktion der Promotor Aktivitäten von *topA* auf 1% und von *gyrA* auf 4% zur Folge. Aufgrund dieser fast vollständigen Hemmung der Aktivität beider Promotoren wurde der Qsc-Wert bei dieser Konzentration nicht bestimmt

Tabelle 3-21: Einfluss von Angelikawurzel-Extrakt auf den Qsc in *E. coli* DE112

	spez. Aktivität RLU/OD ₅₄₆		spez. Aktivität [%]	Qsc ² (±S) ³	Qsc[%] ⁴
Kontrolle	pPHB92 ¹	1707	100	3,65(±0,10)	100
	pPHB93 ¹	467	100		
+ 2,5 µl Extrakt	pPHB92	986	58	2,10(±0,08)	58
	pPHB93	469	100		
+5 µl Extrakt	pPHB92	371	22	1,54(±0,16)	42
	pPHB93	241	52		
+ 10 µl Extrakt	pPHB92	15	1	n.b.	n.b.
	pPHB93	21	4		

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) S = Standardabweichung; ⁴) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

3.10.4.2 Einfluss von Rautenkraut-Extrakt

Der Extrakt des oberirdischen Teils von *Ruta graveolens* (Rautenkraut) hat eine konzentrationsabhängige Abnahme der Qsc-Werte gezeigt (**Tabelle 3-22**). Die Reduktion beruhte in erster Linie auf einer starken Abnahme der *gyrA*-Promotor-Aktivität, während die *topA*-Promotor-Aktivität sich kaum verändert hatte. Diese Beobachtung der nicht bzw. kaum veränderten *ptopA*-Aktivität steht im Gegensatz zu den Effekten anderer getesteter Substanzen, bei denen eine Abnahme des Qsc immer mit einer deutlichen Senkung der *ptopA*-Aktivität einherging.

Tabelle 3-22: Einfluss von Rautenkraut-Extrakt auf den Qsc in *E. coli* DE112

	spez. Aktivität RLU/OD ₅₄₆		spez. Aktivität [%]	Qsc ² (±S) ³	Qsc[%] ⁴
Kontrolle	pPHB92 ¹	1570	100	3,60(±0,08)	100
	pPHB93 ¹	436	100		
+ 10 µl Extrakt	pPHB92	1562	99	2,46(±0,10)	68
	pPHB93	636	146		

Fortsetzung Tabelle 3-22					
+ 20 µl	pPHB92	1426	91	1,69(±0,07)	47
Extrakt	pPHB93	844	194		

¹⁾ pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²⁾ Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³⁾ S = Standardabweichung; ⁴⁾ der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

3.10.5 Einfluss von ausgewählten Pilzextrakten

Aus einer Sammlung von 46 im norddeutschen Raum gesammelten Pilzen wurden Extrakte hergestellt. In einem Agardiffusionstest zeigten 17 davon eine antibakterielle Aktivität sowohl gegen gramnegative Zellen, wie *E. coli* ATCC 25922, als auch gegen grampositive, wie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Welche Substanz für die in den Pilzextrakten vorhandene antibakterielle Aktivität verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Die Extrakte dieser Pilze wurden daher auf eine mögliche Wirkung gegen Topoisomerase I oder Gyrase getestet. Die Tests erfolgten mit den Konstrukten pPHB92 und pPHB93 in der hyperempfindlichen *E. coli* Mutante D112. Alle getesteten Pilze waren mit Ether extrahiert worden (2.2.21). Die in der **Tabelle 3-23** aufgeführten Ergebnisse wurden mit 20 µl Pilzextrakt ermittelt.

Keiner der getesteten Pilzextrakte trug zu einer deutlichen Veränderung der Qsc-Werte bei. Alle gemessenen Qsc-Werte nach der Zugabe der Pilzextrakte lagen im Bereich von <±10% im Vergleich zum Kontrollwert. Ausnahme war *Trametes versicolor*, dessen Extrakt eine Reduktion des Qsc-Werts von 14% aufwies.

Mehrere Pilzextrakte, wie die Extrakte von *Bulgaria inquinans* und *Tyromyces stipticus*, führten zu Veränderungen der Promotor-Aktivitäten von *ptopA* und *pgyrA*. Diese Veränderungen hatten aber zu keiner bedeutenden Ab- oder Zunahme der Qsc-Werte geführt. Das auffälligste Ergebnis wurde mit dem Extrakt von *Langermania giganteae* ermittelt. Die Zugabe von *Langermania giganteae* (20 µl Extrakt) führte zu einer fast 100%igen Senkung der Luciferase Aktivität. Eine Schädigung der Luciferase durch den Extrakt von *Langermania giganteae* als mögliche Erklärung für diese extreme Reduktion der RLU-Werte konnte ausgeschlossen werden. Die Zugabe des Extrakts (10 und 20 µl) auf die permeabilisierten Zellen vor der Luciferase-Bestimmung hat keine Reduktion der RLU-Werte im Vergleich zur Kontrolle gezeigt (**Tabelle 3-24**). Als positive Kontrolle wurde Proteinase K (50 und 100 µl) mitgeführt, die die RLU-Werte um mehr als

99,9% reduzierte. Wegen der sehr starken Reduktion der RLU-Werte durch die Extrakte von *Langermania giganteae* und *Tyromyces stipticus* wurden die Qsc-Werte nach der Zugabe dieser Extrakte nicht bestimmt.

Tabelle 3-23: Einfluss von Pilzextrakten auf den Qsc in *E. coli* DE112

	Spez. Aktivität RLU/OD ₅₄₆		spezifische Aktivität [%]	Qsc ² (±S) ³	Qsc [%] ⁴
Kontrolle	pPHB92 ¹	1362	100	3,52(±0,02)	100
	pPHB93 ¹	386	100		
1- <i>Merulius tremellosus</i>	pPHB92	1874	138	3,69(±0,01)	105
	pPHB93	508	132		
2- <i>Stropharia aeruginosa</i>	pPHB92	798	59	3,33(±0,02)	95
	pPHB93	240	62		
3- <i>Thelephora palmata</i>	pPHB92	1260	93	3,62(±0,02)	103
	pPHB93	348	90		
4- <i>Panellus stipticus</i>	pPHB92	1374	101	3,71(±0,04)	105
	pPHB93	370	96		
5- <i>Trametes versicolor</i>	pPHB92	1170	86	3,13(±0,03)	89
	pPHB93	374	97		
6- <i>Lycoperdon perlatum</i>	pPHB92	1428	105	3,64(±0,04)	103
	pPHB93	392	102		
7- <i>Tyromyces stipticus</i>	pPHB92	40	3	n.b.	n.b.
	pPHB93	17	4		
8- <i>Ischnoderma benzoinum</i>	pPHB92	1310	96	3,58(±0,05)	102
	pPHB93	366	95		
9- <i>Paxillus involutus</i>	pPHB92	1018	75	3,74(±0,03)	106
	pPHB93	272	70		
10- <i>Phaeolus schweinitzii</i>	pPHB92	1148	85	3,55(±0,03)	101
	pPHB93	323	86		
11- <i>Langermania giganteae</i>	pPHB92	0,6	n.b.	n.b.	n.b.
	pPHB93	0,4	n.b.		
12- <i>Stereum hirsutum</i>	pPHB92	849	62	3,22(±0,03)	92
	pPHB93	264	78		
13- <i>Bjerkandera adusta</i>	pPHB92	490	36	3,22(±0,08)	92
	pPHB93	152	39		
14- <i>Bulgaria inquinans</i>	pPHB92	1959	144	3,37(±0,04)	96
	pPHB93	581	151		
15- <i>Heterobasidion annosum</i>	pPHB92	686	50	3,65(±0,04)	104
	pPHB93	188	49		
16- <i>Hypholoma fasciculare</i>	pPHB92	919	67	3,31(±0,02)	94
	pPHB93	278	72		
17- <i>Lenzites betulina</i>	pPHB92	1150	85	3,31(±0,03)	94
	pPHB93	347	90		

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) S = Standardabweichung; ⁴) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

Tabelle 3-24 Einfluss des Extrakts von *Langermania giganteae* auf die Luciferase

	Kontrolle	Proteinase K		<i>Langermania giganteae</i>	
		50 µl*	100 µl*	10 µl	20 µl
RLU	1179	1,08	0,68	1064	1003

*Aus einer Proteinase K Stammlösung (20 mg/ml)

3.11 Prüfung der Durchführung der Qsc-Bestimmung im Mikrotiterplattenformat für Screeningverfahren mit erhöhtem Probendurchsatz

Um das Testsystem auf eine mögliche Automatisierbarkeit zu überprüfen, wurde neben der in Mikrotiterplatten durchgeführten Luciferase-Bestimmung auch die optische Dichte in transparenten, für die OD-Bestimmung geeigneten Mikrotiterplatten ermittelt (2.2.16.2). In **Tabelle 3-25** sind die Ergebnisse der Qsc-Bestimmung aus drei Versuchen aufgelistet. Bei den drei Versuchen wurden die Proben nicht eingefroren und die RLU-Messung erfolgte parallel mit der OD-Bestimmung. Der erste Versuch (Standard) wurde, wie unter 2.2.16.1 erläutert, durchgeführt. Im zweiten Versuch wurde die OD im Luminometer nach Einstellung des photometrischen Messprogramms ermittelt (2.2.16.2). Beim dritten Versuch wurde die OD 20 min nach der Zugabe des MTT-Reagenzes im Luminometer bestimmt. Dieses Reagenz weist lebende Bakterienzellen durch eine Farbreaktion nach (2.2.19).

Es wurden für die Qsc-Bestimmung zwei Bakterienkulturen verwendet: Eine unbehandelte Kultur (Kontrolle) und eine weitere, die für 60 min mit Novobiocin (1 µg/ml) inkubiert wurde. Aus beiden Kulturen wurden je zwei Proben für die Versuche parallel entnommen: Kontrolle ohne Novobiocin (Probe I) und Messprobe mit Zusatz von 1 µg/ml Novobiocin (Probe II) (**Tabelle 3-25**).

Aufgrund der unterschiedlichen Bestimmung der OD, waren die ermittelten Werte der spezifischen Luciferase-Aktivität der Proben I und II in den drei Versuchen unterschiedlich (**Tabelle 3-25**). Die OD-Werte der mit dem MTT-Reagenz behandelten Proben im dritten Versuch waren deutlich höher, als die ebenfalls im Luminometer ermittelten OD-Werte der Proben des zweiten Versuchs. Deswegen sind die spezifischen RLU-Werte im dritten Versuch deutlich niedriger als die der zwei anderen Versuche. Die errechneten Qsc-Werte waren allerdings nahezu identisch. Die Qsc-Werte der drei Kontrollproben lagen zwischen 3,66 (Versuch 1) und 3,60 (Versuch 2). Die Abnahme des Qsc-Wertes durch Novobiocin lag in den drei Versuchen bei 79 bis 80%.

Tabelle 3-25: Qsc-Bestimmung von DE112 in Mikrotiterplattenformat

	spez. Aktivität RLU/OD ₅₉₅	spez. Aktivität [%]	Qsc ² (±S) ³	Qsc[%] ⁴	
Versuch 1: Standard					
I Kontrolle	pPHB92 ¹	3675	100	3,66(±0,10)	100
	pPHB93 ¹	1004	100		
II +1 µg/ml Novo ⁵	pPHB92	790	21	0,76(±0,01)	20
	pPHB93	1041	104		
Versuch 2: OD im Luminometer					
I Kontrolle	pPHB92	16720	100	3,60(±0,07)	100
	pPHB93	4648	100		
II +1 µg/ml Novo	pPHB92	3077	18	0,78(±0,02)	21
	pPHB93	3955	85		
Versuch 3: OD im Luminometer (+ MTT)					
I Kontrolle	pPHB92	7270	100	3,63(±0,10)	100
	pPHB93	2004	100		
II +1 µg/ml Novo	pPHB92	1362	19	0,77(±0,01)	21
	pPHB93	1768	88		

¹) pPHB92 = pACYC177-*ptopA-luc* / pPHB93 = pACYC177-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) S = Standardabweichung; ⁴) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁵) Novo (Novobiocin) MHK DE112 = 2 µg/ml

3.12 Erweiterung der Anwendbarkeit des Testsystems

Die DNA-Superspiralisierung beeinflusst die Expression vieler Gene, darunter auch Virulenzfaktoren, wie z. B. die Typ1- und P-Fimbrien [6, 45] und Hämolytine [112]. Um den Einfluss von Veränderungen des Superspiralisierungsgrades auf die Expression von Virulenzfaktoren genauer verfolgen zu können und zudem Veränderungen der Superspiralisierung, die durch Akkumulation von Chinolonresistenzmutationen in pathogenen gramnegativen Bakterienspezies entstehen können, zu bestimmen, wurde ein weiteres Paar Reporterplasmide hergestellt. Dieses Reporterplasmidpaar basiert auf einem Plasmid mit breitem Wirtsspektrum, das einen Einsatz in verschiedenen gramnegativen Bakterien ermöglicht.

Im Folgenden (3.12.1) wird die Konstruktion der Reporterplasmide erläutert.

3.12.1 Konstruktion der Reportergenplasmide pPHB94 und pPHB95

Ausgangsplasmid für die Reportergenplasmide pPHB94 und pPHB95 war das Plasmid pBP507. Dieses RSF1010-Derivat ist 9198 bp groß, hat ein breites Wirtsspektrum und liegt aufgrund der stringenten Kontrolle des Replikationsursprungs in geringerer Kopienzahl (10-12 Kopien) als pBR322 und pACYC177 in der Zelle vor [72]. Im Vergleich zu den auf pBR322 und pACYC177 basierenden Reportergenplasmidpaaren (3.1 und 3.8) weisen die auf pBP507 basierenden Derivate zudem eine andere Kombination von Vektorpromotoren relativ zu den rekombinanten Fragmenten *ptopA-luc* und *pgyrA-luc* auf. Im Vergleich der drei Reportergenplasmidpaare lassen sich somit artifizielle Genexpressionsänderungen, die sich möglicherweise aufgrund der Aktivität von Vektorpromotoren ergeben, minimieren.

Das Plasmid pBP507 enthält neben den Resistenzgenen für Amikacin (*aacA*), Kanamycin (*aphA*) und Gentamicin (*aadB*) Gene für Mobilisierungsfaktoren, die eine Konjugation des Plasmids in Anwesenheit von Helferplasmiden, wie z.B. RP1/RP4 ermöglichen. Zur Herstellung der Reportergenplasmide wurde pBP507 zunächst nach Standardbedingungen mit der Restriktionsendonuklease *NsiI* verdaut. Für *NsiI* existieren in pBP507 zwei Schnittstellen, die sich an den Positionen 567 bp und 833 bp innerhalb des für Kanamycinresistenz codierenden Bereichs befinden. Die nach Restriktionsspaltung resultierenden Fragmente (266 bp und 8932 bp) wurden über ein Agarosegel getrennt. Die große Bande wurde gemäß Punkt 2.2.7.1 aus dem Gel reisoliert und gereinigt. Anschließend wurden die mit SOEing (Abbildung 2.2) hergestellten Fusionsprodukte *ptopA-luc* und *pgyrA-luc* separat in das verdaute Plasmid kloniert.

Als Vorlage für eine PCR des Fusionskonstrukts *ptopA-luc* diente das Plasmid pGEM5zf(+)-T21. Mit den Primern TOPA5-1 und LUC3-3 wurde das Fragment amplifiziert. Für die Generierung des Fusionskonstrukts *pgyrA-luc* wurde das Plasmid pGEM5zf(+)-G62 als Vorlage verwendet und in einer PCR mit den Primern GYRA5-1 und LUC3-3 amplifiziert. Beide Primer enthalten an ihrem 5'-Ende Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *PstI* (**Tab. 2-2**), mit dem die Fusionskonstrukte anschließend gespalten wurden. Aufgrund der Kompatibilität der Schnittstellen *NsiI* und *PstI* konnten die entsprechend behandelten Fragmente

pgyrA-luc und *ptopA-luc* nach Spaltung mit *Pst*I in das mit *Nsi*I geschnittene Plasmid kloniert werden. Im Gegensatz zu den Klonierungen in pBR322 (3.1) und pACYC177 (3.8), wo nach Charakterisierung der Klone jeweils zwei Orientierungen des Inserts gefunden wurden, konnte bei den Klonen mit dem auf pBP507 basierenden Reportergensystem jeweils nur eine Orientierung isoliert werden. Nach mehreren Klonierungsversuchen wurden zwar Klone gefunden (Anteil dieser Klone betrug < 2%), die das Fusionskonstrukt in der zweiten Orientierung besitzen, diese Klone zeigten aber keine Luciferase-Aktivität. In **Tabelle 3-26** ist das Ergebnis der Luciferase-Bestimmung von acht repräsentativen Klonen dargestellt. Die Orientierung I der Konstrukte pBP507-*ptopA-luc* pBP507-*pgyrA-luc* zeigte deutliche Aktivität, hingegen wurden bei Orientierung II kaum RLU gemessen.

Tabelle 3-26: RLU-Werte in pPB507-Konstrukte enthaltenden Klonen

Klon	1*	2*	3	4	5*	6*	7	8
RLU	1075	1158	0,05	0,10	450	430	0,05	0,05

Klone 1-4 enthalten den Konstrukt pPB507-*ptopA-luc*; 5-8 pPB507-*pgyrA-luc*

*Orientierung I

Mit den Reportergenplasmiden pPHB94 (pBP507-*ptopA-luc*) und pPHB95 (pBP507-*pgyrA-luc*) (**Abbildung 3-12**) wurden Zellen des *E. coli* Stammes C600SN transformiert, mit dem im Vergleich zu DH5 α oder JM109 die höchsten Ausbeuten an Transformanden erzielt wurden. Aus C600SN wurden anschließend die zwei Reportergenplasmide in die Teststämme konjugiert oder transformiert. Die Charakterisierung der beiden Konstrukte erfolgte gemäß 3.2. Die Optimierung der Messbedingungen erfolgte analog der Vorgehensweise, die mit pPHB90 und pPHB91 unter 3.3 erklärt worden ist (Daten nicht gezeigt). Die gleichen Messbedingungen eigneten sich ebenfalls für das auf pPB507 basierende Testsystem.

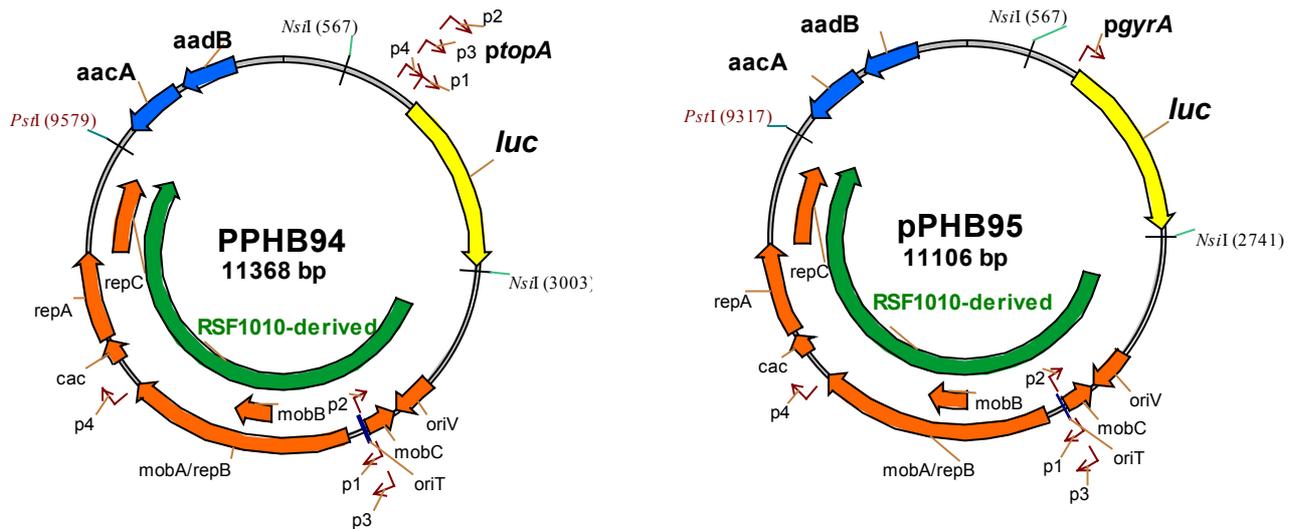


Abb. 3-12: Reportergenplasmide pPHB94 und pPHB95

3.12.2 Spezifität und Validität des Reportergensystems

3.12.2.1 Auswirkung von Mutationen in *gyrA* und *topA* auf die Superspiralisierung

Wie schon mit den von pPB322 (Tabelle 3-2) und pACYC177 (Tabelle 3-14) abgeleiteten Testsystemen gezeigt wurde, wurde hier die Superspiralisierung der zwei Mutanten KD112 (Mutation in *gyrB*) und RS2 (Mutation in *topA*) getestet (weitere Beschreibung des Versuchs unter 3.4.1).

Die mit dem pPHB94 / pPHB95 Testsystem durchgeführte Qsc-Bestimmung ergab für KD112, im Vergleich zu JTT1 (WT), einen um 15% reduzierten Qsc-Wert (Tabelle 3-27). RS2 zeigte einen um 75% erhöhten Qsc-Wert.

Tabelle 3-27: Einfluss von Topoisomerase I- und Gyrase-Mutationen auf die Superspiralisierung

Stamm	$\frac{Qsc^2}{pPHB94/pPHB95^2}$	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
JTT1	4,30	100	4,6
KD112 (<i>gyrB226</i>)	3,67	85	4,3
RS2 (<i>topA10</i>)	7,52	175	2,7

¹) pPHB94 = pBP507-*ptopA-luc* / pPHB95 = pBP507-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴) S = Standardabweichung;

3.12.2.2 GyrA-Inhibitoren

Die auf der Basis von pBP507 hergestellten Reporterplasmide haben nach der Zugabe von Nalidixinsäure (0,5 und 1 x MHK) keine deutliche Abnahme (>10%) des Qsc-Wertes gezeigt (**Tabelle 3-28**). Die Aktivitäten beider Promotoren nahmen konzentrationsabhängig ab.

Tabelle 3-28: Wirkung von GyrA-Inhibitoren auf den Qsc-Wert

Stamm	GyrA-Inhibitor [µg/ml]	spez. Aktivitäten <i>ptopA</i> / <i>pgyrA</i> pPHB94/pPHB95 ¹	Qsc ²	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
WT	-	2292 / 924	3,03	100	4,3
WT	Nal ⁵ 2	1942 / 660	2,94	94	1,7
WT	Nal 4	1604 / 573	2,80	92	2,5

¹) pPHB94 = pBP507-*ptopA-luc* / pPHB95 = pBP507-*pgyrA-luc*

²) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴) S = Standardabweichung; ⁵) Nal (Nalidixinsäure) MHK WT = 4 µg/ml

3.12.2.3 GyrB-Inhibitoren

Mit dem von pBP507 abgeleiteten Reportergensystem pPHB94 / pPHB95 wurde in WT und JTT1 aufgrund der Hemmung der Gyrase durch Novobiocin eine deutliche Abnahme der Qsc-Werte gemessen. Diese Abnahme betrug 27% (WT) bzw. 33% (JTT1) (**Tabelle 3-29**). Das auf pBP507 basierende Reportergensystem reagierte in WT zudem empfindlicher auf Novobiocin als in JTT1. Während in WT bereits die subinhibitorische Konzentration von 0,25 x MHK (32 µg/ml) den Qsc um 27% reduzierte, wurde eine entsprechende Reduktion in JTT1 (28%) erst durch die MHK (125 µg/ml) erreicht.

Tabelle 3-29: Wirkung von GyrB-Inhibitoren auf den Qsc-Wert

Stamm	GyrB-Inhibitor [µg/ml]	spez. Aktivitäten <i>ptopA</i> / <i>pgyrA</i> pPHB94/pPHB95 ¹	Qsc ²	Qsc [%] ³	S [%] ⁴
JTT1	-	2264 / 500	4,53	100	4,6
JTT1	Novo ⁵ 75	1748 / 480	3,64	80	3,3
JTT1	Novo 125	1487 / 456	3,26	72	6,1
JTT1	Novo 200	1439 / 477	3,02	67	5,3
WT	-	2292 / 924	3,03	100	4,3
WT	Novo ⁶ 32	1271 / 574	2,20	73	4,6

¹) pPHB94 = pBP507-*ptopA-luc* / pPHB95 = pBP507-*pgyrA-luc* (Fortsetzung Seite 82)

²⁾ Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ³⁾ der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt. ⁴⁾ S = Standardabweichung; ^{5,6)} Novo (Novobiocin) MHK für WT und JTT1 = 128 µg/ml

3.13 Bestimmung von Qsc-Werten verschiedener attenuierter *Salmonella Typhimurium* Stämme

Eine weitere Anwendung des Testsystems, neben der Suche nach neuen Hemmstoffen für die bakteriellen Topoisomerasen, war die Untersuchung der Superspiralisierung in pathogenetisch bedeutsamen Bakterien wie den Salmonellen. Der *Salmonella Typhimurium* (*S. Tm.*) Stamm TAD *Salmonella vacT* ist ein attenuierter Lebendimpfstamm. Aus dem isogenen Ausgangsstamm *S. Tm.* M415 wurde *vacT* durch Mehrschritt-Mutagenese mit anschließender Selektion auf reduzierte Virulenz gewonnen. Neben vier Punktmutationen in *gyrA*, die zu Aminosäureaustausch führten (**Tabelle 3-30**), zeigte TAD *Salmonella vacT* eine reduzierte Generationszeit [140]. In diesem Versuch wurde die DNA-Superspiralisierung in TAD *Salmonella vacT* mit dem auf pPB507 basierenden Testsystem untersucht. Als Kontrolle dienten der Ausgangsstamm M415 und die beiden Mutanten Nal2ori und Nal2passage, die als Zwischenprodukte bei der Herstellung von TAD *Salmonella vacT* isoliert worden waren.

Die ermittelten Qsc-Werte sowie die vorhandenen *gyrA*-Mutationen sind in **Tabelle 3-30** aufgelistet. Die Mutanten Nal2ori und Nal2passage mit den drei *gyrA*-Mutationen zeigten einen deutlich geringeren Qsc-Wert als der Ausgangsstamm M415 (58% bzw. 62%). Der ermittelte Qsc-Wert in TAD *Salmonella vacT* unterschied sich dagegen mit 93% kaum von M415 (WT). Diese Mutante besitzt neben den drei in Nal2ori und Nal2pass vorhandenen Mutationen eine vierte Punktmutation in *gyrA*, die zu einem Aminosäureaustausch Trp59 zu Arg führt.

(Die Daten zu den *Salmonella*- Mutanten sind mit Ausnahme der Qsc-Daten Bestandteil der noch laufenden Dissertation von Dipl.-Biol. Antje Preisler, Abt. Pharm. Biologie u. Mikrobiologie, Universität Hamburg).

Tabelle 3-30: Einfluss von *gyrA*-Mutationen auf den Qsc in *Salmonella Typhimurium* Stämmen

<i>S. Tm.</i>	<i>gyrA</i> -Mutationen	Qsc ¹ (\pm S) ²	Qsc[%] ³
M415	keine	4,15(\pm 0,12)	100
Nal2ori	Gly 75 zu Ala Asp 87 zu Gly Ser 876 zu Ile	2,39(\pm 0,13)	58
Nal2passage	Gly 75 zu Ala Asp 87 zu Gly Ser 876 zu Ile	2,56(\pm 0,21)	62
vacT	Trp 59 zu Arg Gly 75 zu Ala Asp 87 zu Gly Ser(AGC)876 zu Ile(ATC)	3,87(\pm 0,13)	93

¹) Qsc = spez. Aktivität *ptopA* / *pgyrA*, angegeben sind Mittelwerte aus mindestens drei verschiedenen Experimenten; ²) S = Standardabweichung; ³) der prozentuale Qsc-Wert für die Ausgangsstämme wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, molekularbiologische Nachweisverfahren zu entwickeln, mit denen Veränderungen im DNA-Superspiralisierungsgrad *in vivo*, d.h. unter „Echtzeit-Bedingungen“ detektiert werden können, ohne aufwendige Isolierungsschritte, Auftrennung in Gelen oder radioaktive Markierung.

Zudem sollte das Testsystem für Screeningverfahren zur Detektion von Hemmstoffen für Topoisomerasen einsetzbar sein, die einen maßgeblichen Anteil an der Kontrolle des Superspiralisierungsgrades der DNA haben. Die Mechanismen, die für die Aufrechterhaltung des chromosomalen Superspiralisierungsgrades gelten, treffen auch für Plasmide zu. Zwar unterscheiden sich die absoluten Werte der Superspiralisierung von Plasmid und Chromosom, doch sind die zu beobachtenden Veränderungen vergleichbar, so dass die in einem Plasmid vorliegende Superspiralisierung als Maß für die Situation im Chromosom gelten kann [3, 8, 117]. Für die Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Testsysteme ergaben sich zwei Schwerpunkte. Zum einen der Einsatz zur Charakterisierung des Superspiralisierungsgrades (in Form von Qsc-Wert) in Wildtyp und Mutanten sowie unter verschiedenen Umweltbedingungen und zum anderen die Anwendung des Testsystems zur Detektion möglicher alternativer Inhibitoren bakterieller Topoisomerasen.

4.1 Bisher angewandte Methoden zur Bestimmung der Superspiralisierung

Die bislang angewandten Methoden zur Bestimmung des Superspiralisierungsgrades von DNA sind *In-vitro*-Verfahren, die mit zeitaufwändigen Isolierungs- und Färbungsschritten von Plasmid- oder Chromosomen-DNA verbunden sind. So werden z.B. Reporterplasmide mittels Zentrifugation in einem Cäsiumchloridgradienten isoliert und in Agarosegelen mit Zusatz von Chloroquin, das durch Interkalation zwischen die Basen der DNA eine Aufspreitung in die unterschiedlichen Topoisomere bei der Elektrophorese ermöglicht, aufgetrennt. Der Superspiralisierungsgrad der isolierten Moleküle ist natürlich nicht identisch, sondern ist statistisch um die intensivste Bande verteilt, die einen mittleren Superspiralisierungsgrad markiert [71, 101, 125, 148]. Zur Quantifizierung wird dabei die von Keller [98] beschriebene Bandenzähl-Methode verwendet: Hierzu wird zunächst die Verknüpfungszahl Lk_0 eines vollständig relaxierten DNA-Moleküls berechnet, indem man die Anzahl der Basenpaare durch 10,5 (Anzahl der Basen pro

Helixwindung) dividiert [193]. Zur Bestimmung des Superspiralisierungsgrades wird im Vergleich dazu die Verknüpfungszahl Lk von nicht vollständig relaxierten Topoisomeren aus ihrer abweichenden elektrophoretischen Mobilität errechnet. Dabei legt man zugrunde, dass sich die Verknüpfungszahl zweier benachbarter Banden um den Wert 1 unterscheidet. Die Differenz der Verknüpfungszahl ΔLk zwischen dem Topoisomer mittlerer Superspiralisierung und dem vollständig relaxierten Lk_0 wird durch einfaches Auszählen der Banden ermittelt. Der Quotient $\Delta Lk / Lk_0$ ergibt dann definitionsgemäß die Superspiralisierungsdichte σ an.

Die von Wu *et al.* beschriebene zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung solcher DNA-Topoisomeregemische erlaubt eine bessere Auftrennung als die normale eindimensionale, weil damit Topoisomere getrennt werden können, die einen quantitativ gleichen, aber entgegengesetzt gerichteten Superspiralisierungsgrad aufweisen (positiv bzw. negativ) [190].

Elektrophoretische Methoden weisen jedoch einige Nachteile auf: Es können während der DNA-Isolierungsprozedur DNA-Bindeproteine entfernt werden, so dass für die isolierte DNA der gemessene Superspiralisierungsgrad *in vitro* von dem tatsächlichen *in vivo* abweicht. Darüber hinaus muss für jedes Reporterplasmid die geeignete Chloroquin-Konzentration ermittelt werden. Abhängig von der eingesetzten Chloroquin-Konzentration wandern z.B. Topoisomere mit hoher negativer Superspiralisierung wie solche mit geringerer und Topoisomere mit geringer negativer Superspiralisierung wie solche mit positiver Superspiralisierung [159].

Für die Bestimmung der chromosomalen Superspiralisierung können unter anderem Saccharose-Dichtegradienten verwendet werden [161]. Dazu muss die DNA in intakter Form isoliert und anschließend in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid im Saccharose-Dichtegradienten sedimentiert werden. Wie Chloroquin kann Ethidiumbromid durch Einlagerung in die DNA den negativen Superspiralisierungsgrad reduzieren. Mit dieser Relaxierung der DNA nimmt die Sedimentationsgeschwindigkeit ab. Bei Erhöhung der Ethidiumbromid-Konzentration werden positive Superspiralen eingeführt, dadurch wird die DNA wieder kompakter und die Sedimentationsrate erhöht sich wieder. Durch das Verhältnis Sedimentationsrate zur titrierten Ethidiumbromid-Konzentration wird die Superspiralisierung in den verschiedenen Stämmen miteinander verglichen. Diese Methode erfordert eine radioaktive Markierung der bakteriellen DNA während des Wachstums mit ^3H -Thymidin. Eine

Unterscheidung positiver und negativer Superspiralisierung ist damit nur unter großem technischen Aufwand und nur indirekt möglich.

4.2 Entwicklung des Testsystems

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Testsystem verwendet ein leicht detektierbares Reporter-gen *luc*, das durch gezielte Klonierung unter die Kontrolle von Promotoren gebracht wurde, deren Aktivitäten in Abhängigkeit vom Superspiralisierungsgrad reguliert werden. Das Reporter-gen *luc* codiert für Luciferase des nordamerikanischen Feuerschwanzes *Photinus pyralis* „firefly“ und stellt eines der empfindlichsten Reporter-gene dar, da es die Quantifizierung von Enzymmengen bis 10^{-20} mol erlaubt [20, 188]. Das eukaryontische *luc*-Gen liegt als intronfreie cDNA vor. Außerdem benötigt das Genprodukt Luciferase keine posttranslationale Modifikation, und besitzt daher auch nach der Translation in Prokaryonten seine volle katalytische Aktivität [35].

Die Luciferase aus *Photinus pyralis* zeigte in Vergleichsstudien zur bakteriellen Luciferase, die vom *lux*-Operon aus *Vibrio fischeri* codiert wird, eine höhere Empfindlichkeit für Veränderungen in der Expression verschiedener Gene [66]. Weiterhin führt die Expression der im *lux*-Operon enthaltenen Gene (*luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD* und *luxE*) zu einer autonomen Lumineszenz, die eine Zugabe von Luciferin nicht erforderlich macht. Dadurch wäre jedoch die Wahl des Zeitpunkts für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität, wie es in dieser Arbeit vorgesehen war, nicht gewährleistet.

Durch die transkriptionale Fusion der superspiralisierungsabhängigen Promotoren *ptopA* und *pgyrA* mit dem Reporter-gen *luc* mittels SOEing (Abb. 2.1) wurde dieses exakt an der Position, an der sich das ursprüngliche Gen befand, positioniert. Dadurch kann gewährleistet werden, dass die Expression des Reporter-gens genau der gleichen Regulation unterliegt wie das ursprüngliche Protein. So wird der eine im Testsystem eingesetzte Promotor des für Topoisomerase I codierenden *topA*-Gens (*ptopA*) durch erhöhte Superspiralisierung der DNA aktiviert, während die Aktivität des anderen Promotors *pgyrA* (Promotor der A-Untereinheit von Gyrase) reduziert wird. Bei einer verminderten DNA-Superspiralisierung verhalten sich die Promotoraktivitäten genau umgekehrt. Veränderungen der Superspiralisierung der DNA haben einen reziproken Einfluss auf die Aktivität der im Testsystem

eingesetzten Promotoren *ptopA* und *pgyrA* und lassen sich über die Aktivität der Luciferase messen.

Die drei Reporter-genplasmidpaare, die durch die Klonierung der Fusionsprodukte *ptopA-luc* und *pgyrA-luc* in die Plasmide pBR322 (3.2), pACYC177 (3.7) und pBP507 (3.14.1) erhalten wurden, unterscheiden sich einerseits in Bezug auf ihren *origin of replication* (*ori*), und damit in ihrer Kopienzahl in den Zellen [72, 152], andererseits in ihrem Wirtsbereich (*host range*), wodurch unterschiedliche Testmikroorganismen verwendet werden können. Die beiden Reporter-genplasmide eines Paares unterscheiden sich jeweils in dem Promotor, der mit dem Reporter-gen *luc* fusioniert ist. Die Verwendung verschiedener Paare von Reporter-genplasmiden erlaubt es auch Messergebnisse, die mit einem Paar erhalten wurden, zu verifizieren.

Der Grad der DNA-Superspiralisierung in der Bakterienzelle wird durch den Qsc-Wert (spezifische Aktivität von *ptopA* / spezifische Aktivität von *pgyrA*) widergespiegelt. Dieser Wert beschreibt das Verhältnis der Aktivität von Luciferase, die über den Promotor *ptopA* bzw. *pgyrA* expremiert wird. Eine erhöhte negative Superspiralisierung wird durch die Zunahme des Qsc-Werts angezeigt, während eine verminderte negative Superspiralisierung (= Relaxierung) durch einen reduzierten Qsc-Wert signalisiert wird. Die Verwendung eines Quotienten Qsc bietet den Vorteil, dass nicht die absolute Veränderung der Aktivität nur eines Promotors ausschlaggebend ist, sondern der physiologische Einfluss der DNA Topologie auf zwei Promotoren und deren Änderungen der Aktivität im Verhältnis zueinander berücksichtigt werden.

4.3 Messbedingungen

Für einen Einsatz des Testsystems bei der Untersuchung der Superspiralisierung wurden zunächst eine Reihe von Versuchen zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Messung der Aktivität in Form von relative light units (RLUs) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der von der Herstellerfirma des Luciferin-Testkits Promega vorgegebene Einfrierschritt der Proben vor der Messung nicht erforderlich ist (Tabelle 3-1). Diese Erkenntnis ist im Hinblick auf die beabsichtigte Durchführung der Messungen in Mikrotiterplatten und eine Automatisierung des Systems von großer Bedeutung. Durch die Variation zwischen

den in den Tests eingesetzten Probenvolumina und Luciferin-Mengen, die in dem Luciferin-Assay-Reagent (LAR) des Herstellers enthalten sind, konnte die für die einzelne Messung vom Hersteller empfohlene LAR-Menge (100 µl) auf 25 µl reduziert werden (Abb. 3-2). Bei Einsatz des Testsystems in Screeningverfahren mit erhöhtem Probendurchsatz ist diese Reduktion der LAR-Menge als Kostenfaktor nicht zu vernachlässigen (100 ml LAR kosten fast 600 Euro).

Die Berechnung der spezifischen Luciferase-Aktivität durch Bezug der RLU-Werte auf die OD (3.3.3), erlaubt es, Schwankungen der RLU-Werte durch unterschiedliche Bakterienzellzahlen auszuschließen und ermöglicht außerdem eine schnelle Ermittlung der spezifischen Aktivitäten. Darüber hinaus können die OD-Werte im Gegensatz zur Zellzahl- und Proteinbestimmung in Mikrotiterplatten ermittelt werden (3.13), was das Testsystem für den Einsatz in Screeningverfahren prädestiniert.

4.4 Charakterisierung der Superspiralisierung

Der Nachweis, dass die hergestellten Reporterplasmide tatsächlich die intrazelluläre Superspiralisierung in den Bakterienzellen widerspiegeln, erfolgte durch eine Reihe von Qsc-Bestimmungen in verschiedenen bereits charakterisierten Mutanten und unter verschiedenen Umweltbedingungen.

4.4.1 Einfluss von bekannten *gyrA*- und *topA*-Mutationen auf den Qsc-Wert

Veränderungen in den Enzymaktivitäten von Topoisomerase I und Gyrase aufgrund bestimmter Mutationen in den dafür codierenden Genen führen zu Veränderungen der Superspiralisierung in den jeweiligen Bakterienstämmen [44, 141, 145, 149, 161, 162].

Für die Etablierung und Verifizierung des Testsystems wurde die Superspiralisierung von drei isogenen *E. coli* Stämmen bestimmt, die sich von dem Ausgangsstamm JTT1 sowie voneinander durch eine Mutation im *gyrB*-Gen (*gyrB226* in KD112) bzw. eine Mutation in *topA*-Gen (*topA10* in RS2) unterscheiden und daher Unterschiede im Superspiralisierungsgrad der DNA aufweisen.

Mit allen drei Paaren der Reporterplasmide zeigte RS2 einen höheren Qsc-Wert als JTT1. Die Zunahme lag zwischen 75%, ermittelt mit dem auf pBP507 basierenden Testsystem (Tabelle 3-27), und 98% mit dem aus pBR322 abgeleiteten Testsystem (Tabelle 3-2). Messungen mit den Reporterplasmiden pPHB92/pPHB93 ergaben eine Zunahme um 82% (Tabelle 3-14). Diese Daten

stimmen qualitativ mit der von Steck *et al.* beschriebenen Erhöhung der chromosomalen Superspiralisierung von RS2 überein [161]. Das Ausmaß der Erhöhung wurde von diesen Autoren jedoch mit Hilfe der unter 4.1 erklärten Saccharose-Dichtegradienten-Methode bestimmt und betrug lediglich 8%. Die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und Berechnung der Superspiralisierung, wie z.B. die von Steck angewandte Methode von Hinton und Bode [85, 86], könnten eine Erklärung für die Unterschiede zwischen den Werten der Superspiralisierung sein.

Für KD112 wurden Qsc-Werte ermittelt, die niedriger waren als die des Kontrollstamms JTT1. Die mit den Reporterplasmiden pPHB92/pPHB93 ermittelte Abnahme des Qsc um -73% (Tabelle 3-14) war deutlich größer als die mit dem auf pBP507 (-15%) basierenden Testsystem (Tabelle 3-27). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, neben dem deutlichen Unterschied in der Größe von pBP507 (9,2 kbp) im Vergleich zu pACYC177 (3,94 kbp), die unterschiedliche Kopiezahl. PBP507 liegt mit einer Kopiezahl von 10-12 Kopien pro Zelle vor. pACYC177 weist eine Kopiezahl von 15 Kopien pro Zelle auf [152].

Literaturdaten zeigen aufgrund der *gyrB* Mutation eine um 17% verringerte Superspiralisierung in KD112 im Vergleich zum Wildtyp JTT1 [161]. Der quantitative Unterschied hier ist wie bei den Ergebnissen mit RS2 mit den unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und der Berechnung des Superspiralisierungsgrades zu begründen.

Mit den Reporterplasmiden pPHB90/pPHB91 war eine Untersuchung des Superspiralisierungsgrades in KD112 nicht möglich, da die Tetracyclin-Resistenz von KD112 eine Selektion von plasmidhaltigen Stämmen nicht ermöglichte. Die anstelle von KD112 mit diesem Testsystem untersuchte *gyrA* Mutante WT-3-1 (*gyrA*^{S83L, D87G}) zeigte eine Abnahme des Qsc um 21% im Vergleich zum Wildtyp WT (Tabelle 3-2). Daten aus der Dissertation von Simone Bagel ergaben für WT-3-1 einen um 17% reduzierten Superspiralisierungsgrad [6], der mit Hilfe eines Reportergensystems mit *tem1*, das Gen für die β -Laktamase (*bla*), ermittelt wurde. Die aufwendige Bestimmung der β -Laktamase-Aktivität sowie mögliche Hintergrundaktivität in Bakterienstämmen, die β -Laktamasen besitzen, machen solche Reporterplasmide für Screeningverfahren untauglich.

Versuche mit der Standard-Methode zur Analyse der Superspiralisierung in chloroquinhaltigen Agarosegelen mit pBR322 als Reporterplasmid (Abb. 3-5) [7] bestätigen qualitativ die mit den Reporterplasmiden ermittelten Veränderungen des Superspiralisierungsgrades. Aufgrund der höheren negativen Superspiralisierung und damit der höheren Kompaktheit der aus RS2 isolierten pBR322-Topoisomere stieg die Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber denen von DNA aus JTT1 und KD112 an (Abb. 3-5). Auch in diesem Fall (vergleiche 4.1) zeigt ein Vergleich der hier *in vivo* ermittelten Daten zum Superspiralisierungsgrad mit Werten, die durch elektrophoretische Methoden *in vitro* ermittelt worden sind, dass quantitative Unterschiede bestehen, wofür methodische und Berechnungsunterschiede als ursächlich anzunehmen sind.

Die ermittelten Qsc-Werte der untersuchten Mutanten RS2 und KD112 entsprachen den Literaturdaten qualitativ und bestätigten die prinzipielle Funktionsweise des Testsystems. Eine Mutation in *gyrA*, die wie bei KD112 die Aktivität der Gyrase beeinträchtigt, hat eine Verringerung des Superspiralisierungsgrades in der Bakterienzelle zur Folge. Auf transkriptionaler Ebene bedeutet das nach dem Modell der homöostatischen Kontrolle [41, 116, 141], dass die Expression von *gyrA* zu- und die von *topA* abnimmt. Der aus den spezifischen Aktivitäten der Promotoren dieser beiden Gene errechnete Qsc-Wert (spezifische Aktivität *ptopA* / spezifische Aktivität *pgyrA*) muss in solchem Fall, wegen der Abnahme der Expression von *topA* und der Zunahme von *gyrA*, abnehmen (Tabellen 3-14 und 3-27). Die Mutation im *topA*-Gen von RS2 bewirkt das Gegenteil, nämlich eine Erhöhung des Superspiralisierungsgrades. Offensichtlich sind zu starke Abweichungen vom durchschnittlichen Superspiralisierungsgrad nicht tolerabel. RS2 muss daher als Folge der Mutation in *topA* eine oder mehrere kompensatorische Mutationen besitzen, die bislang jedoch nicht beschrieben sind. Anscheinend sind diese jedoch nicht ausreichend, um die Gyrase-Aktivität so zu beeinträchtigen, dass der Qsc-Wert von JTT1 (WT) erreicht wird. Die Folge ist eine Erhöhung der Expression von *topA* und eine Reduktion der von *gyrA*. Daraus resultiert eine Zunahme des Qsc-Wertes wie in den Tabellen 3-2, 3-14 und 3-27 gezeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die DNA-Superspiralisierung von *Salmonella Typhimurium* Stämmen, die mehrere *gyrA*-Mutationen aufweisen, untersucht. Die

Superspiralisierung des attenuierten Impfstamms vacT, der vier *gyrA*-Mutationen jeweils verbunden mit einem Aminosäureaustausch aufweist, betrug 93% des Qsc-Werts, der für den Wildtyp M415 bestimmt worden war (Tabelle 3-30). Die zwei Mutanten Nal2ori und Nal2pass unterscheiden sich von vacT nur hinsichtlich der Punktmutation, die an Position 59 einen Aminosäureaustausch von Tryptophan zu Arginin verursacht [140]. Beide zeigten deutlich geringere Qsc-Werte als M415 und vacT. Nal2ori zeigte einen um 42% und Nal2passage um 38% (Tabelle 3-30) reduzierten Qsc im Vergleich zu M415. Bei vacT scheint die Punktmutation, die zum beschriebenen Aminosäureaustausch an Position 59 führt, daher eine kompensatorische Rolle zum Erreichen des normalen Superspiralisierungsgrades zu spielen (Weitere Daten hierzu in der Dissertation von A. Preisler, in Vorbereitung).

4.4.2 Superspiralisierung nach Hemmung von GyrA

Die bakterizide Wirkung der Chinolone (GyrA-Inhibitoren) beruht auf der Hemmung der Religation des durch die Gyrase geschnittenen DNA-Doppelstrangs. Chinolone binden an den Gyrase-DNA Komplex und formieren dabei stabile ternäre Komplexe [27, 60], welche die Replikation [83] und die Transkription [184] beeinträchtigen. Durch noch nicht verstandene Abläufe entstehen DNA-Doppelstrangbrüche, die eine SOS-Antwort auslösen und schließlich den Zelltod verursachen [46, 50, 137, 138, 184].

Die getesteten Inhibitoren der bakteriellen Topoisomerase II Moxifloxacin und Nalidixinsäure, die an den A-Untereinheiten angreifen, zeigten mit allen Paaren von Reporterplasmiden eine Verringerung der Qsc-Werte (Tabellen 3-3; 3-15; 3-28). Die durch Moxifloxacin (Fluorchinolon) gebildeten ternären Komplexe beeinträchtigen anscheinend die Gyrase-Aktivität, wodurch keine oder wenig negative Superspiralen in die DNA eingeführt werden können, während die Relaxierungsaktivität von Topoisomerase I unbeeinträchtigt bleibt. Das Ergebnis ist eine Reduktion der Superspiralisierung, die durch einen reduzierten Qsc-Wert wiedergegeben wird (Tabellen 3-3; 3-15). Eine Hemmung der Superspiralisierung wurde durch Fluorchinolone wie Ciprofloxacin, Norfloxacin, PD0163449 [10] und das an C-8 fluorierte 6-Desfluorchinolon BMS-284756 [105] gezeigt. Nalidixinsäure (Chinolon) hat eine Reduktion des Superspiralisierungsgrades, in Form von Qsc, hervorgerufen (Tabellen 3-3; 3-15; 3-28). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der von Ohtsuka et

a/. beschriebenen Induktion der DNA-Relaxierung in *E. coli* durch Nalidixinsäure [130].

Die aufgrund der homöostatischen Kontrolle [116] erwartete Abnahme der spezifischen *ptopA* Aktivität wurde bei allen Tests festgestellt (Tabellen 3-3; 3-15; 3-28). Hingegen war die erwartete Zunahme der spezifischen *pgyrA*-Aktivität nur mit Nalidixinsäure (Chinolon) in den auf pBR322 und pACYC177 basierenden Testsystemen feststellbar (Tabellen 3-3; 3-15). Moxifloxacin (Fluorchinolon) führte zur Reduktion beider Promotoraktivitäten, wobei die Abnahme der *ptopA*-Aktivität deutlich größer war als die von *pgyrA*, was zu einer Nettoabnahme des Qsc führte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die durch Moxifloxacin induzierten Schäden der DNA zu Doppelstrangbrüchen und Verlust der Lebensfähigkeit, d. h. Abnahme aller Transkripte, führt. Hingegen können die durch Nalidixinsäure entstandenen Schäden teilweise repariert werden [130].

Das aus pBP507 abgeleitete Reportergensystem scheint auf GyrA-Inhibitoren weniger empfindlich zu reagieren als die zwei anderen Testsysteme. Während die Zugabe von 1 x MHK Nalidixinsäure bei den Reportergenplasmiden pPHB90/pPHB91 eine Abnahme des Qsc von 27% (Tabelle 3-3) und bei pPHB92/pPHB93 eine Reduktion des Qsc-Werts um 31% zur Folge hatte, wurde bei einer entsprechenden Nalidixinsäurekonzentration mit den Reporterplasmiden pPHB94/pPHB95 eine Senkung von lediglich 8% gemessen. Die Ursachen hierfür sind nicht bekannt. Möglicherweise wirken sich die in pPHB94 und pPHB95 eingeführten negativen Superspiralen aufgrund der Molekülgröße weniger stark aus und führen zu einer geringeren Veränderung der Promotoraktivität.

4.4.3 Superspiralisierung nach Hemmung von GyrB

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten GyrB-Inhibitoren waren die Aminocumarine Novobiocin und Coumermycin A (Abb. 4.1). Beide sind katalytische Inhibitoren der Gyrase, die an die B-Untereinheit der Gyrase binden und sie in eine Konformation überführen, die eine geringe Affinität zu ATP besitzt [114, 123]. Topoisomerase I wird nicht durch Novobiocin oder Coumermycin A gehemmt, so dass es zur Reduktion der negativen Superspiralisierung, d.h. zur Relaxierung kommt [63].

Eine Senkung der Superspiralisierung nach katalytischer Hemmung der B-Untereinheit der Gyrase konnte mit allen drei Testsystemen gezeigt werden (Tabellen 3-4; 3-16; 3-29). Die Abnahme der Qsc-Werte nach Zugabe von Novobiocin zu den untersuchten Bakterienstämmen war dabei konzentrationsabhängig. Subinhibitorische und inhibitorische Konzentrationen von Novobiocin ($1/4 \times$, $1/2 \times$ und $1 \times$ MHK) verursachten zudem eine stärkere Abnahme des Qsc als entsprechende Konzentrationen von Moxifloxacin oder Nalidixinsäure. So führte Moxifloxacin in WT mit dem auf pBR322 basierenden Reporter gensystem zu einer Reduktion des Qsc von 8% bei $1 \times$ MHK bzw. von 29% bei $2 \times$ MHK (Tabelle 3-3), während die Reduktionen mit Novobiocin 36% ($1/8 \times$ MHK) bzw. 62% ($1/4 \times$ MHK) betragen (Tabelle 3-4). Entsprechende Ergebnisse wurden auch für die TolC-Mutante DE112 mit dem auf pACYC177 basierenden Reporter gensystem gemessen. Nalidixinsäure führte hier zu einer Reduktion des Qsc um 31% bei $1 \times$ MHK (Tabelle 3-15), während Novobiocin bereits bei $1/2 \times$ MHK zu einer Reduktion von 71% führte (Tabelle 3-16).

Durch den Einsatz der hyperempfindlichen *E. coli* TolC-Mutante DE112 konnte die Empfindlichkeit des Testsystems deutlich erhöht werden. Die *tolC*-Mutation erhöht die Empfindlichkeit der Zellen für ein breites Spektrum von Antibiotika, einschließlich der Fluorchinolone (GyrA-Hemmer) und Aminocumarine (GyrB-Hemmer) [165]. Bei *E. coli* stellt das Effluxsystem AcrAB-TolC das für Antibiotikaresistenz bedeutendste dar [165]. Dadurch konnten Veränderungen der Qsc-Werte in DE112 schon bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen als bei WT, wie z. B. nach der Zugabe von Novobiocin (Tabelle 3-4 mit WT und 3-16 mit DE112), detektiert werden.

Die stärkere Abnahme der Qsc-Werte mit Novobiocin, im Vergleich zu den GyrA-Inhibitoren, wurde ebenfalls mit dem aus pBP507 abgeleiteten Reporter gensystem gemessen, während der Qsc-Wert von WT um 8% mit $1 \times$ MHK Nalidixinsäure sank (Tabelle 3-28), wurde bereits mit $1/4 \times$ MHK Novobiocin eine Abnahme von 27% (Tabelle 3-29) ermittelt.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten von DNA Microarray Untersuchungen, die bei *E. coli* eine Deregulation der Expression der Topoisomerase I- und Gyrase-Gene durch Chinolone erst bei Konzentrationen über der MKH zeigten [95, 158].

Das aus pBP507 abgeleitete Testsystem zeigte sich im Vergleich zu den beiden anderen Testsystemen nicht nur gegenüber GyrA-Inhibitoren weniger empfindlich, wie oben erklärt (4.3.2), sondern auch gegenüber GyrB-Inhibitoren. So wurde mit den auf pBR322 basierenden Reporterplasmiden in WT eine Abnahme des Qsc-Wertes von 62% nach Inkubation mit einer Novobiocinkonzentration von $1/4 \times \text{MHK}$ ($32 \mu\text{g/ml}$) gemessen (Tabelle 3-4), während das auf pBP507 basierende Testsystem bei gleicher Konzentration lediglich eine Abnahme von 27% zeigte (Tabelle 3-29).

Als positive Kontrolle für einen Einsatz im Naturstoffscreening wurde die Wirkung des Kulturüberstands des Novobiocin-Produzenten *Streptomyces caeruleus* (früher *Streptomyces sphaeroides*) auf die Superspiralisierung in der hyperempfindlichen *E. coli* TolC-Mutante De112 (3.6) getestet.

Der Kulturüberstand des Novobiocin-Produzenten *Streptomyces caeruleus* zeigte eine inhibitorische Aktivität auf die Superspiralisierung, wie die Reduktion des Qsc-Wertes zeigt (Tab. 3-19). Die Abnahme des Qsc-Wertes um 18% mit einem Kulturüberstand, der eine Novobiocin-Aktivität entsprechend einer Konzentration von $0,75 \mu\text{g/ml}$ enthielt (Tabelle 3-19), fiel deutlich geringer aus als die Abnahme, die mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Novobiocin (42%) als Reinsubstanz beobachtet wurde (Tabelle 3-16). Grund dafür könnte die bessere Qualität des reinen Novobiocin sein, da beim Produzenten in der Regel eine Mischung verschiedener Biosynthesestufen vorliegt, die sich hinsichtlich der Aktivität gegen Gyrase unterscheiden können.

4.4.4 Einfluss von Gyrase-Inhibitoren auf die Mutante WT-3-1 (*gyrA*^{S83L,D87G})

In einem weiteren Versuch wurde der Effekt von Ciprofloxacin (GyrA-Inhibitor) und Novobiocin (GyrB-Inhibitor) auf die Superspiralisierung von WT und WT-3-1 untersucht. WT-3-1 war hergestellt worden, indem eine *gyrA*-Doppelmutation (S83L und D87G) durch *in-vitro*-Mutagenese in WT eingeführt wurde [6]. Ciprofloxacin ($1 \times \text{MHK}$) reduzierte den Qsc-Wert in WT um 26% und in WT-3-1 um 2% (Tabelle 3-5). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass in WT-3-1 als Folge der *gyrA*-Doppelmutation nicht Gyrase sondern Topoisomerase IV das primäre Ziel für Ciprofloxacin darstellt. Dadurch wird die aufgrund der Doppelmutation schon beeinträchtigte Gyrase – WT-3-1 zeigte einen geringeren Qsc (0,93) als WT (1,32) (Tabelle 3-5) – kaum durch Ciprofloxacin gehemmt. Dieses Ergebnis lässt vermuten,

dass die Relaxierung der DNA nicht maßgeblich von Topoisomerase IV kontrolliert wird, da sonst durch die Hemmung von Topoisomerase IV die Expression von *topA* gestiegen wäre, um das entstandene Defizit in der Relaxierung der DNA zu kompensieren. In solchem Fall müsste ein Anstieg des Qsc-Werts ermittelt werden.

Die nach der Zugabe von 1 x MHK Ciprofloxacin gemessene Abnahme des Qsc-Werts in WT (Tabelle 3-5) steht im Einklang mit der von Barnard *et al.* beschriebenen Hemmung der Superspiralisierung durch Ciprofloxacin [10].

Im Gegensatz zu Ciprofloxacin führte die Zugabe des GyrB-Inhibitors Novobiocin (1/4 x MHK) zu einer deutlichen Reduktion des Qsc-Werts nicht nur in WT (66%), sondern auch in WT-3-1 um 48% (Tabelle 3-5). Der gleiche Novobiocin MHK-Wert (128 µg/ml) für WT und WT-3-1 deutet darauf hin, dass GyrB in WT3-1 die gleiche Empfindlichkeit für Novobiocin aufweist wie GyrB von WT.

4.4.5 Einfluss variierender Inkubationsbedingungen

Im Rahmen der Arbeit sollte auch die Frage beantwortet werden, in welchem Ausmaß Umweltbedingungen die Regulation der DNA-Superspiralisierung beeinflussen. Mehrere Studien haben sich mit dieser Fragestellung schon beschäftigt und einen Einfluss von Nährstoffangebot, Osmolarität sowie Wachstumsphase auf die Superspiralisierung nachgewiesen [8, 43, 67, 93, 94, 148, 173]. In diesen Studien wurde die Superspiralisierung in Chloroquin-Gelen d. h. *in vitro* untersucht.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten Reporterplasmide wurden die Einflüsse von Umweltbedingungen *in vivo* qualitativ und quantitativ untersucht.

4.4.5.1 Nährstoffgehalt

Die Superspiralisierung von *E. coli* WT wurde unter gleichen Inkubationsbedingungen in drei verschiedenen Nährmedien untersucht. Davon waren zwei Vollmedien (Standard Nährbouillon No.1 und LB- (Luria Bertani) Bouillon) und das dritte Nährmedium war das M9 Minimalmedium. Während M9 Minimalmedium nur die für das Wachstum von WT unbedingt notwendigen Nährstoffe enthält, sind in den zwei Vollmedien dagegen noch weitere Verbindungen enthalten, die nicht unbedingt lebensnotwendig sind, das Wachstum jedoch fördern.

Während die ermittelten Qsc-Werte für die zwei Vollmedien Standard Nährbouillon No.1 und LB- (Luria Bertani) Bouillon (Tabelle 3-7) ähnlich waren, wurde ein deutlich

geringerer Qsc-Wert (64 - 67%) im M9 Minimalmedium gemessen. Dieser Befund steht im Einklang mit Untersuchungen von Balke und Gralla, die ebenfalls eine reduzierte Superspiralisierung in nährstoffarmen Medien zeigten [8]. Der Vergleich der Osmolarität der Medien ergab, dass diese in M9 Minimalmedium mehr als doppelt so hoch ist als in den zwei Vollmedien. Literaturdaten verbinden hohe Osmolarität mit einem Anstieg der Superspiralisierung [94], was im Gegensatz zu den hier vorgelegten Daten steht. Eine plausible Erklärung hierfür wäre, dass der geringe Nährstoffgehalt im M9 Minimalmedium einen stärkeren Effekt auf die Superspiralisierung ausübt als die Osmolarität. Um den Einfluss der Osmolarität auf den Superspiralisierungsgrad zu quantifizieren, wurde der Qsc unter variierender Osmolarität in einem Vollmedium bestimmt.

4.4.5.2 Osmolarität

Der Einfluss variierender Osmolarität auf die Superspiralisierung wurde mit *E. coli* WT in LB-Medien mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen untersucht. Es wurde eine Zunahme der Qsc-Werte mit steigender NaCl-Konzentration im Nährmedium festgestellt (Tabelle 3-8). Diese Zunahme der Superspiralisierung wird in der Literatur auf das bei erhöhter Osmolarität gesteigerte [ATP] / [ADP] Verhältnis zurückgeführt, das zur verbesserten Aktivität der Gyrase aufgrund der höheren ATP-Konzentration führt [93, 94].

4.4.5.3 Wachstumsphase

Die Verfolgung der Veränderungen in der DNA-Superspiralisierung in *E. coli* WT während des Wachstums von der frühen exponentiellen Phase bis zur stationären Phase ergab konstante Qsc-Werte im Laufe der exponentiellen Wachstumsphase (Tabelle 3-9). Mit Beginn der stationären Wachstumsphase (OD = 0,9) wurde eine Verringerung des Qsc-Werts ermittelt, die im Laufe der stationären Phase weiter abnahm, bis ein Qsc-Wert von 0,87 erreicht wurde. Diese Verringerung der Superspiralisierung reflektiert die in der Literatur beschriebene Relaxierung der DNA von *E. coli* in der stationären Wachstumsphase [8, 43, 156, 173]. Diese Relaxierung wird mit Nährstoffmangel, niedrigem ATP-Gehalt sowie morphologischen und physiologischen Veränderungen in den Bakterienzellen, wie Kondensation der

Nukleotide, Degradation der Proteine und generelle Abnahme der Transkription und Translation, während der stationären Wachstumsphase begründet [104].

4.4.6 Bestimmung der Qsc-Werte in Mikrotiterplattenformat

Im Hinblick auf den Einsatz des Testsystems in Screeningverfahren mit erhöhtem Probendurchsatz zur Detektion von neuen Hemmstoffen der bakteriellen Topoisomerase I und Gyrase wurde die Qsc-Bestimmung, wie in 3.11 erklärt, in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Die in Mikrotiterplatten erhaltenen Qsc-Werte (Versuche 2 und 3 in Tabelle 3-25) zeigten sowohl für die Kontrolle (3,60 und 3,63) als auch nach Zugabe des GyrB-Inhibitors Novobiocin (1 µg/ml) Abnahme der Qsc-Werte um 20%. In Versuch 1 (Tabelle 3-25), der nach dem Standard-Verfahren (2.2.16.1) durchgeführt wurde, sind fast die gleichen Qsc-Werte sowohl für die Kontrolle als auch nach der Zugabe von Novobiocin ermittelt worden. Das im Versuch 3 eingesetzte MTT-Reagenz, das lebende Bakterienzellen durch eine Farbreaktion nachweist (2.2.19), eignet sich für die Anwendung als Indikator für mögliche Cytotoxizität der zu testenden Substanzen und Extrakte.

Aufgrund dieser Ergebnisse eignet sich das entwickelte Testsystem für einen Einsatz in Screeningverfahren mit erhöhtem Probendurchsatz.

4.5 Detektion möglicher Inhibitoren der Topoisomerase I und Gyrase

Nach dem Einsatz des Testsystems zur Charakterisierung der Superspiralisierung unter verschiedenen Bedingungen und dem Nachweis, dass mit dem Testsystem Veränderungen des Superspiralisierungsgrades *in vivo* verfolgt werden können, wurden eine Reihe von Reinsubstanzen und Extrakten auf eine mögliche Wirkung gegen Topoisomerase I oder Gyrase untersucht.

4.5.1 Isolierte Naturstoffe als potentielle Inhibitoren

Von den isolierten Naturstoffen führten Simocyclinon D8, Herniarin und Xanthotoxin zu einer deutlichen Veränderung des Qsc-Wertes, während andere, wie Rubradirin und Helenalin, mäßige oder keine Wirkung zeigten.

Simocyclinon D8 (Abbildung 3-6) ist ein neu entdecktes Antibiotikum aus *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 [166]. Simocyclinon D8 besitzt antibiotische

Aktivität gegen grampositive Bakterien und zeigt cytotoxische Aktivitäten gegen humane Tumorzellen [152]. Die Struktur von Simocyclinon D8 besteht aus zwei Komponenten, eine davon ist ein 3-Amino-4,7-Dihydroxy-Cumarin, das auch als Grundgerüst in den Antibiotika Novobiocin und Coumermycin A vorkommt (Abb. 4.1). Tyrosin fungiert als Vorstufe für diesen Aminocumarin-Ring, der eine wichtige Rolle für die Bindung dieser Komponenten an die B-Untereinheit der Gyrase spielt [108,168].

Simocyclinon D8 führte zu einer starken Abnahme des Qsc-Werts. Die höchste getestete Konzentration ergab eine Reduktion von 69% (Tabelle 3-10). Mit Simocyclinon D8 (5 und 10 µg/ml) wurden unterschiedliche Antworten der *topA* und *gyrA* Promotoren registriert, nämlich eine Abnahme der *ptopA*- und eine Erhöhung der *pgyrA*-Aktivität (Tabelle 3-10). Dieser Effekt deutet aufgrund der von Menzel und Gellert postulierten homöostatischen Kontrolle [116] auf eine Hemmung der enzymatischen Aktivität der Gyrase hin.

In einer aktuellen Arbeit von Flatman *et al.* wurde die Hemmwirkung von Simocyclinon D8 auf die bakterielle Gyrase *in vitro* nachgewiesen [57]. Aufgrund der in dieser Studie vorgelegten Daten wurde ein neuartiger Wirkungsmechanismus von Simocyclinon D8 auf die Gyrase postuliert, der sich von dem des Gyrase-Hemmers Novobiocin dadurch unterscheidet, dass Simocyclinon D8 offensichtlich nicht als Inhibitor der ATPase-Aktivität der Gyrase B-Untereinheit wirkt. Es wird aufgrund der in dieser Studie gezeigten 10fach geringeren Aktivität von Simocyclinon D8 auf eine GyrA Trp⁸³-Mutante im Vergleich zu deren Wildtyp (GyrA Ser⁸³) vermutet, dass Simocyclinon D8 stattdessen die A-Untereinheit der Gyrase zum Ziel hat. Der neue Wirkungsmechanismus von Simocyclinon D8 öffnet den Weg zur Herstellung von anderen Simocyclinon-Derivaten. Aufbauend auf jüngsten Erkenntnissen zur Biosynthese von Simocyclinon und auf Ergebnissen der DNA-Sequenzanalyse der daran beteiligten Enzyme, die sich in einem Gencluster befinden, sollte es mit Hilfe der kombinatorischen Biosynthese möglich sein, rasch eine Palette von neuartigen Derivaten herzustellen [61, 167].

In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal Daten zur Wirkung von Simocyclinon D8 *in vivo* gezeigt werden.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit dem für die Bindung der Aminocumarine an die B-Untereinheit der Gyrase wichtigen Aminocumarin-Ring wurden zwei Vertreter der Cumarine, Xanthotoxin und Herniarin, auf eine mögliche Wirkung gegen Gyrase getestet.

Xanthotoxin (8-Methoxypsoralen, ein Furanocumarin) besitzt eine Cumarin Grundstruktur. Xanthotoxin hat zu einer starken Reduktion des Qsc-Werts geführt (Tabelle 3-20), verbunden mit einer sehr starken Erhöhung der *pgyrA*-Aktivität (235%) und Abnahme der *ptopA*-Aktivität auf 27%.

Der Auslöser dieser Antwort ist vermutlich durch die beschriebene Einlagerung von Xanthotoxin in die DNA strukturell bedingt. Planare Furanocumarin-Derivate, wozu Xanthotoxin zählt, werden zwischen die Pyrimidinbasen der DNA als Interkalator angelagert. Dadurch wird die Replikation und Transkription der DNA gehemmt [28, 120]. Dafür spricht das Ergebnis der Behandlung der Zellen mit dem DNA-Interkalator Ethidiumbromid, die eine Reduktion der *ptopA*- und eine Erhöhung der *pgyrA*-Aktivität verursachte (Tabelle 3-18). Die Abnahme des Qsc-Werts kam durch die Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA und nicht durch eine spezifische Hemmung der Gyrase oder Topoisomerase I zustande.

Herniarin (Hydroxycumarin) weist eine Cumarin-Grundstruktur auf. Aufgrund von gemeinsamen strukturellen Grundelementen der Aminocumarine, zu denen Novobiocin als katalytischer Inhibitor der Gyrase zählt [114, 123], wurde ein möglicher Effekt dieser Cumarine auf die Superspiralisierung untersucht. Eine antibakterielle Wirkung von Herniarin wurde zwar schon beschrieben [24, 96], ob es allerdings eine spezifische anti-Gyrase-Wirkung aufweist, ist noch nicht untersucht worden. Herniarin reduzierte den Qsc-Wert konzentrationsabhängig durch Reduktion der *ptopA*- und Erhöhung der *pgyrA*-Aktivität (Tabelle 3-20). Dieser Effekt deutet entweder auf eine spezifische Hemmung der Gyrase oder einen strukturellen Effekt durch Einlagerung von Herniarin in die DNA, wie das Ergebnis der Kontrolle mit dem nicht katalytischen Inhibitor Ethidiumbromid zeigte (Tabelle 3-19).

Weiterhin wurden zwei Substanzen auf einen möglichen Einfluss auf die Gyrase oder Topoisomerase I untersucht, die keine deutlichen Effekte auf den Qsc-Wert hervorgerufen haben. Zum einen Rubradirin (Abbildung 3-7), ein Ansamycin-

ähnliches Chinon aus *Streptomyces achromogenes*, das eine mäßige konzentrationsunabhängige Abnahme des Qsc-Werts bewirkte (Tabelle 3-11), die eventuell auf die beschriebene Hemmung der Proteinsynthese durch Rubradirin zurückzuführen ist. Rubradirin bildet in *E. coli* einen stabilen Komplex mit der 30S-Untereinheit des Ribosoms und blockiert dadurch die Bildung und Funktion des Initiationskomplexes gegenüber dem AUG-Startcodon der mRNA und Formylmethionyl-tRNA [119, 147].

Bei der zweiten Substanz handelte es sich um Helenalin. Für Helenalin, ein Sesquiterpen isoliert aus *Arnica chamissonis* (Abbildung 3-8), wurden antibakterielle und antimykotische Aktivitäten beschrieben [144, 185]. Helenalin hat bei den getesteten Konzentrationen keinen Einfluss auf den Qsc-Wert gezeigt (Tabelle 3-12). Die Abnahme der Aktivitäten von *ptopA* und *pgyrA* deuten auf einen unspezifischen Effekt hin, der möglicherweise mit einem Einfluss auf die Proteinsynthese zu erklären ist, dafür spricht der kaum veränderte Qsc-Wert.

4.5.2 Extrakte

Neben den reinen Naturstoffen wurden Pflanzen- und Pilzzellen auf eine mögliche Wirkung gegen Gyrase und Topoisomerase I untersucht. Bei den getesteten pflanzlichen Extrakten handelte es sich um einen Wurzelextrakt aus *Angelica archangelica* ssp. *Litoralis* (Angelika-Wurzel) und einen Blattextrakt aus *Ruta graveolens* (Rautenkraut). Beide Pflanzenteile sind dafür bekannt, dass sie verschiedene Cumarin-Derivate beibehalten [88, 182], die auf eine Aktivität gegen die Topoisomerase I und Gyrase untersucht werden sollten.

Die Untersuchung des Wurzelextrakts aus *Angelica archangelica* ssp. *Litoralis*, für den antibakterielle Aktivität beschrieben, aber die Ursache nicht näher untersucht wurde [182], ergab eine deutliche Reduktion des Qsc-Werts, die auf die Abnahme der Aktivitäten von *ptopA* und *pgyrA* zurückzuführen ist (Tabelle 3-21). Dieser Effekt ist zumindest teilweise auf die im Extrakt enthaltenen Furanocumarine, darunter auch Xanthotoxin, zurückzuführen. Im Wurzelextrakt von *Angelica archangelica* ssp. *Litoralis* befinden sich außer Furanocumarinen auch Cumarine, Phenolcarbonsäuren, Archangelenon, Sitosterol und Gerbstoffe [88].

Die Blätter von *Ruta graveolens* besitzen antibakterielle Aktivität. In einem Agardiffusionstest hemmten sie das Wachstum von *Bacillus subtilis*, *E. coli* und *Staphylococcus aureus* [186, 187]. Der Extrakt des oberirdischen Teils von *Ruta graveolens* (Rautenkraut) rief eine Senkung des Qsc-Werts hervor, die allerdings im Gegenteil zu allen bisherigen Daten fast ausschließlich auf eine Erhöhung der *pgyrA*-Aktivität zurückzuführen ist (Tabelle 3-22). *ptopA* hat keine (mit 10 µl Extrakt) bzw. eine geringe Abnahme von 9% mit 20 µl Extrakt gezeigt. Bisher war eine starke Abnahme des Qsc (>50%) bei allen getesteten Reinsubstanzen und dem Extrakt aus Angelikawurzel mit einer Reduktion der *ptopA*-Aktivität von mindestens 30% verbunden. Diese Beobachtung bietet einen interessanten Ausgangspunkt für eine weitergehende Isolierung und Charakterisierung potentieller Wirkstoffe aus dem Extrakt von *Ruta graveolens*, für den bekannt ist, dass er Furanocumarine (z.B. Xanthotoxin), Cumarine (z.B. Herniarin), Furochinolone und Flavonoide enthält [88].

Eine Untersuchung von 17 Pilzextrakten, die in einem Agardiffusionstest antibakterielle Aktivität sowohl gegen gramnegative Zellen, wie *E. coli* ATCC 25922, als auch gegen grampositive, wie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 zeigten (Daten nicht gezeigt), auf eine mögliche Wirkung gegen Topoisomerase I oder Gyrase, ergab bei keinem der untersuchten Extrakte eine eindeutige Veränderung des Qsc-Wertes (Tabelle 3-23). Die durch den Extrakt von *Bulgaria inquinans* verursachte Zunahme der Aktivitäten von *ptopA* (44%) und *pgyrA* (51%) oder die Abnahme durch den Extrakt von *Bjerkandera adusta* (über 60% für beide Promotoren) hat keine deutliche Veränderung des Qsc-Wertes hervorgerufen.

Auffällig war die fast 100%ige Reduktion der *ptopA*- und *pgyrA*-Aktivität durch den Extrakt von *Langermania giganteae*. Die Zugabe des Extrakts hatte weder die Generationszeit noch die Zellzahl der Bakterien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verändert (Daten nicht gezeigt) und auch die Luciferase als Protein nicht beschädigt (Tabelle 3-24). Der Extrakt hat vermutlich einen starken Einfluss auf die Proteinsynthese.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Testsystem eröffnet die Möglichkeit zu einer einfachen und raschen *in vivo*-Bestimmung des Superspiralisierungsgrades der bakteriellen DNA. Das Testsystem bietet gegenüber der bisher als Standard-Methode angewandten Bestimmung der Superspiralisierung in chloroquinhaltigen

Agarosegelen den Vorteil, dass es keine Isolierung oder Färbung der DNA benötigt und daher wesentlich schneller Ergebnisse liefert. Im Gegensatz zu letzterem werden auch nicht nur Momentaufnahmen des DNA-Superspiralisierungsgrades zu bestimmten Zeitpunkten erhalten, sondern es konnten Veränderungen im Grad der Superspiralisierung infolge von Mutationen in den für die Aufrechterhaltung der Superspiralisierung verantwortlichen Genen von Gyrase und Topoisomerase I detektiert werden. Die Folgen der spezifischen Hemmung der A- und B-Untereinheiten der Gyrase sowie die Konsequenzen der Einlagerung von interkalierenden Substanzen in die DNA, wie Ethidiumbromid, für den Superspiralisierungsgrad der Bakterienzellen konnten mit dem Testsystem ermittelt werden. Durch den Einsatz der hyperempfindlichen *E. coli* TolC-Mutante DE112 konnte die Empfindlichkeit des Testsystems deutlich erhöht werden. Substanzen, die in niedrigen Konzentrationen in zu testenden Extrakten vorkommen und eventuell eine Hemmwirkung auf die Topoisomerase I oder Gyrase haben, können damit besser detektiert werden.

Das neue Testsystem eignet sich für Screeningverfahren mit erhöhtem Probendurchsatz zur Detektion von neuen Hemmstoffen der bakteriellen Topoisomerase I und Gyrase und bietet die Option für eine Automatisierung in Mikrotiterplattenmaßstab.

5 Zusammenfassung

Topoisomerase I und Gyrase kontrollieren in Bakterienzellen die DNA-Superspiralisierung. Aufgrund der essentiellen Funktion und der ubiquitären Verbreitung von Gyrase haben hoch wirksame Inhibitoren, wie Fluorchinolone, eine große Bedeutung als Antibiotika mit breitem Indikationsgebiet erlangt. Die zunehmende Resistenzentwicklung auch gegen diese synthetische Antibiotikaklasse schränkt jedoch ihre Anwendung mehr und mehr ein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von molekularbiologischen Nachweisverfahren, mit denen die Ermittlung neuer Inhibitoren von Gyrase und Topoisomerase I über eine Detektion der Veränderungen im Superspiralisierungsgrad *in vivo* möglich ist. Damit unterscheidet sich das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Testsystem von allen bisher für die Untersuchung der Superspiralisierung in Bakterienzellen angewandten *In-vitro*-Verfahren durch einfache und rasche Durchführung, hohe Empfindlichkeit und exakte Bestimmung des Superspiralisierungsgrades.

Die Bestimmung des DNA-Superspiralisierungsgrades *in vivo* erfolgte mit drei verschiedenen Reporterplasmidpaaren, die das Reportergen *luc* unter der Kontrolle eines vom Superspiralisierungsgrad jeweils reziprok abhängigen Promotors (*ptopA* oder *pgyrA*) tragen. Mit diesem Testsystem ließen sich Veränderungen des Superspiralisierungsgrades aufgrund unterschiedlicher Einflüsse, wie (I) die spezifische Inhibition der Gyrase (durch Fluorchinolone und Aminocumarine) (II) die durch Mutationen hervorgerufenen Beeinträchtigungen der Enzymaktivitäten von Topoisomerase I und Gyrase (III) die auf äußere Faktoren, wie Interkalation von Ethidiumbromid, Änderung der Osmolarität oder des Nährstoffangebots zurückzuführenden Veränderungen der DNA-Superspiralisierung, detektieren.

Das Testsystem bietet die Möglichkeit potentielle alternative Hemmstoffe von Gyrase und Topoisomerase I sowie interkalierende Hemmstoffe zu identifizieren. Darüber hinaus erlauben die Messdaten eine Quantifizierung der Wirkung von Fluorchinolonen und Aminocumarinen auf molekularer Ebene.

Das Testverfahren wurde im Naturstoffscreening sowohl von Kulturüberständen als auch von Extrakten und Reinsubstanzen eingesetzt. Durch die Verwendung der

hyperempfindlichen *E. coli* TolC-Mutante DE112 konnte die Sensitivität des Testsystems gesteigert werden.

Für einen Einsatz als Screeningverfahren mit erhöhtem Probendurchsatz ist das Testsystem erfolgreich für die Bestimmung des Superspiralisierungsgrades in Mikrotiterplattenformat eingesetzt worden und bietet sich damit besonders für ein Wirkstoffscreening an.

Summary

Control of DNA supercoiling is carried out by topoisomerase I and gyrase in bacterial cells. Due to its essential function and ubiquitous distribution, gyrase is target structure of the highly effective antibacterial fluoroquinolones. However, increasing development of resistance to these synthetical antibiotics restricts their application against infectious diseases.

Aim of this work was the development of a molecularbiological assay, which allows the discovery of novel antibiotics targeting topoisomerase I and gyrase by detection of changes in supercoiling in vivo. In contrast to existing assays, the system presented here offers high sensitivity and accuracy as well as facile and rapid handling.

Determination of the DNA supercoiling degree in vivo was carried out using three different pairs of reporter gene plasmids, containing the promoter of either topoisomerase I (*ptopA*) or gyrase (*pgyrA*) transcriptionally fused to the reporter gene *luc*. Alterations in the supercoiling degree due to various effects, such as specific inhibition of gyrase, mutations in topoisomerase I and gyrase genes as well as external factors like nutrition supply, were detectable by using the developed assay.

The test system offers the opportunity to identify new and potential specific inhibitors of topoisomerase I and gyrase as well as structural inhibitors like DNA-intercalating agents. Additionally, quantification of the impact of fluoroquinolones and aminocumarins is possible.

The assay has been used for screening of supernatants of bacterial cultures, herbal extracts and various isolated substances. By applying the hypersensitive *E. coli tolC*-mutant DE112 sensitivity of the system was increased significantly.

Determination of the supercoiling degree was successfully carried out in microtiter plates, which establishes the opportunity of high sample throughput.

6 Literatur

1. **Abraham, E. P., E. Chain.** 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev. Infect. Dis.* (1988). 10:677-678
2. **Abu Mraheil, M.** 1999. Entwicklung eines Luciferase-Reportergensystems zur Bestimmung des Superspiralisierungsgrades in Bakterien. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
3. **Aleixander, V., G. Herrera, and M. Blanco.** 1991. Effekts of ciprofloxacin on plasmid DNA supercoiling of *Escherichia coli* topoisomerase I and gyrase mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:20-23.
4. **Apfel, CM., S. Evers, C. Hubschwerlen, W. Pirson, M. G. P. Page, and W. Keck.** 2001. Peptid Deformylase as an Antibacterial Drug Target: Assays for Detection of Its Inhibition in *Escherichia coli* Cell Homogenesates and Intact Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**:1053-1057.
5. **Austin, E. A., J. F. Graves, L. A. Hite, C. T. Parker, and C. A. Schnaitman.** 1990. Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by *Escherichia coli* K-12: insertion mutagenesis of the *rfa* locus. *J. Bacteriol.* **172**:5312-5325.
6. **Bagel, S.** 1998. Adhärenzeigenschaften chinolonresistenter *E. coli*-Isolate. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
7. **Bagel, S., V. Hüllen, B. Wiedemann and P. Heisig.** 1999. Impact of *gyrA* and *parC* Mutations on Quinolone Resistance, Doubling Time and Supercoiling Degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:868-875.
8. **Balke, V. L. and J. D. Gralla.** 1987. Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:4499-4506.
9. **Bamberger, D. M., L. R. Peterson, D. N. Gerding, J. A. Moody, and C. E. Fasching.** 1986. Ciprofloxacin, azlocillin, ceftizoxime and amikacin alone and in combination against gram-negative bacilli in an infected chamber model. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**:51-63.
10. **Barnard, F. M. and A. Maxwell.** 2001. Interaction between DNA Gyrase and Quinolones: effects of Alanine Mutations at GyrA Subunit Residues Ser⁸³ and Asp⁸⁷. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1994-2000
11. **Bast, E.** 1999. Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Spektrum Akademischer Verlag.

12. **Bax, R. P.** 1998. Antibiotic resistance – What can we do? *Nature Med.* **4**: 545-546.
13. **Bax, R., Mullan, N. & J., Verhoef.** 2000. The millennium bugs – the need for and development of new antibacterials. *Int. J. Antimicrob. Agents* **16**:51-59.
14. **Berger J. M., S. J. Gamblin, S. C. Harrison and J. C. Wang.** 1996. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* **379**:225-232.
15. **Bergerat, A., B. de Massay, D. Gadelle, P. C. Varoutas, A. Nicolas and P. Forterre.** 1997. An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**:414-417.
16. **Birnboim, H. C. and J. Dolly .** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
17. **Blanche, F., B. Cameron, F. X. Bernard, L. Maton, B, Manse, L. Ferrero, N. Ratet, C. Lecoq, A. Goniot, D. Bisch, and J. Cruozet.** 1996. Differential behaviours of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II topoisomerases. *Antimicrob. Agents chemother.* **40**:2714-2720.
18. **Bliska J. B. and N. R. Cozzarelli.** 1987. Use of site-specific recombination as probe of DNA structure and metabolism *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **194**:205-218.
19. **Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Green, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, H. W. Boyer, S. Crosa, and S. Falkow.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene.* **2**:95-113.
20. **Bornstein, I., J. Fortin, P. E. Stanley, G. S. Stewart, and L. Kricka.** 1994. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. **219**:169-181.
21. **Brown P.O. and N. R. Cozzarelli.** 1979. A sign inversion mechanism for enzymatic Supercoiling of DNA. *Science.* **206**:1081-1083.
22. **Brown P.O. and N. R. Cozzarelli.** 1981. Catenation and knotting of duplex DNA by top I topoisomerases: a mechanistic parallel with top II topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:843-847.
23. **Buhler, C., D. Gadelle, P. Forterre, J. C. Wang and A. Bergerat.** 1998. Reconstitution of DNA topoisomerase IV of the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* from subunits sperately overexpressed in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **26**:5157-5162.
24. **Bukelew A. R., A. Chakravarti, W. R. Burge, V. M. Thomas, and M. Ikawa.** 1972. Effect of Mycotoxins and coumarins on the growth of *Bacillus megaterium* from spores. *J. Agr. Food Chem.* **20**:431-437.

25. **Champoux J.J.**, 1990. In DNA topology and its biological effects, ed. J. C. Wang, N. R. Cozzarelli, pp. 217-242. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.
26. **Champoux, J. J.** 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:369-413.
27. **Chen, A. Y. and L. F. Liu.** 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and letha targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**:191-218.
28. **Cimino, G. D., H. B. Gamber, S. T. Isaacs, J. E. Hearst.** 1985. Psoralens as photoactive probes of nuclear acid stucture and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **54**:1151-1193.
29. **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.U.S.A* **69**:2110-2114.
30. **Cook, D. N., Ma, D., Pon, N. G. and J. E. Hearst.** 1992. Dynamics of DNA supercoiling by transcription in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:4772-4776.
31. **Courvalin, P.** 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1447-1451.
32. **Courvalin, P.** 1996. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**:855-869.
33. **Crisona, N. J., T. R. Strick, D. Bensimon, V. Croquette, and N. R. Cozzarelli.** 2000. Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev.* **14**:2881-2892.
34. **Crumplin, G. C., M. Kenwright, and T. Hirst.** 1984. Investigations into the mechanism of action of the antibacterial agent norfloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* **13 Suppl. P.**:9-23.
35. **de Wet, J. R., 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.
36. **Deitz, W. H., T. M. Cook., and W. A. Goss.** 1966. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. 3. Conditions required for lethality. *J. Bacteriol.* **91**:768-773.

37. **Deutsches Institut für Normung e.V.** 1990. Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika - Mikrodilution (DIN 58940 Teil 8). Deutsches Institut für Normung e.V., Berlin.
38. **DiGate, R. J. and K. J. Marians.** 1988. Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **263**:13366-13373.
39. **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.
40. **DiMasi, J. A., R. W., Hansen and H. G. Grabowski.** 2003. The price of innovation: new estimates of drug development costs. J. Health Econ. **835**:1-35.
41. **DiNardo, S., K. A. Voelkel, R. Sternglanz, A. E. Reynolds, and A. Wright.** 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. Cell **31**:43-51.
42. **Dorman, C. J. and N. Ni Bhriain.** 1993. DNA topology and bacterial virulence gene regulation. Trends Microbiol. **1**:92-99.
43. **Dorman C J., G. C., Barr, N. N. Bhriain and C. F. Higgins.** 1988. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. J. Bacteriol. **170**: 2816-2826.
44. **Dorman, C. J., A. S. Lynch, N. N. Bhriain and C. F. Higgins.** 1989. DNA supercoiling in *Escherichia coli*: *topA* mutants can be suppressed by DNA amplifications involving the *tolC* locus. Mol. Microbiol. **3**:531-540.
45. **Dorman, C. J.** 1995. DNA topology and the global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. Microbiology. **141**:1271-1280.
46. **Dougherty, T. J., J. J. Saukkonen.** 1985. Membrane permeability changes associated with DNA gyrase inhibitors in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **28**:200-206.
47. **Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. **16**:6127-6145.
48. **Drlica K. and J. Rouvière-Yaniv.** 1987. Histonelike proteins of bacteria. Microbiol. Rev. **51**:301-319.
49. **Drlica, K.** 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. Mol. Microbiol. **6**:425-433.

50. **Drlica, K., and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:377-392.
51. **Dubreuil, L.** 2002. Peptid-deformylase inhibitors, a new class of antibiotics. *Presse Med.* **38**:1810-1812.
52. **Elkins, C. A., and H. Nikaido.** 2002. Substrat specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J. Bacteriol.* **184**:6490-6498.
53. **Federsel H. J.** 2003. Logistics of process R&D: transforming laboratory methods to manufacturing scale. *Nature Reviews, Drug Discovery* **2** (August):654-664.
54. **Feinberg, H., A. Changela and A. Mondragon.** 1999. Protein-nucleotid interactions in *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nat. Struct. Biol.* **6**:961-968.
55. **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.
56. **Fernández-Moreira, D. Balas, I. Gonzáles, and A. De La Campa.** 2000. Fluoroquinolones inhibit preferentially *Streptococcus pneumoniae* DNA topoisomerase IV than DNA gyrase native proteins. *Microbiol. Drug Resis.* **6**:259-267.
57. **Flatman, R. H., A. J. Howells, L. Heide, H-P. Fiedler and A. Maxwell.** 2004. Simocyclinon D8: an inhibitor of DNA gyrase with a novel mode of action. *J. Antimicrob. Chemother.* In Press.
58. **Fournier, B., X. Zhao, T. Lu, K. Drlica, and D. C. Hooper.** 2000. Selective targeting of topoisomerase IV and DNA gyrase in *Staphylococcus aureus*: different patterns of quinolone-induced inhibition of DNA synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2160-2165
59. **Frenkel, L. and H. Bremer.** 1986. Increased amplification of plasmids pBR322 and pBR327 by low concentrations of chloramphenicol. *DNA* **5**:539-544.
60. **Froelich-Ammon, S. J. and N. Osheroff.** 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**:21429-21432.
61. **Galm, U., J. Schimana, H-P., Fiedler, J. Schmidt, S-M., Li. And L. Heide.** 2002. Cloning and analysis of the Simocyclinone biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Arch. Microbiol.* **178**:102-114.

62. **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 **73**:3872-3876.
63. **Gellert, M., M. H. O'Dea, T. Itoh, and J. Tomizawa.** 1976. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by gyrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**:4474-4478.
64. **Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, T. Itoh, and J. I. Tomizawa.** 1977. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:4772-4776.
65. **Gellert, M.** 1981. DNA topoisomerases. Ann. Rev. Biochem. **50**:879-910.
66. **Gelmini, S.** 1993. In: Proceedings of the VIIth International Symposium of Bioluminescence and Chemoluminescence, Szalay, A. A., Kricka, L. J. and Stanley, P. eds.
67. **Goldstein, E. and K. Drlica.** 1984. Regulation of bacterial DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:4046-4050.
68. **Gonzales, R. D.** 2001. Infections due to the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. Lancet **357**:1179.
69. **Gruber, M. G. and K. V. Wood.** 1992. Quantification of promoter activity in *Escherichia coli* using Firefly luciferase. Promega Corporation. Madison WI.
70. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol Biol. **166**:557-580.
71. **Hardy, C. D. and N. R. Cozzarelli.** 2003. Alteration of *Echerichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:941-947.
72. **Haring, V., P. Scholz, E. Scherzinger, J. Frey, K. Derbyshire, G. Hatfull, N. S. Willetts, and M. Bagdasarian.** 1985. Protein RepC is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:6090-6094.
73. **Hayat M. A. and D. A. Mancarella.** 1995. Nucleoid proteins. Micron. **26**:461-80.
74. **Heddle, J. G., T. Lu, X. Zhao, K. Drlica and A. Maxwell.** 2001. *gyrB*-225, a mutation of DNA gyrase that compensates for topoisomerase I deficiency: Investigation of its low activity and quinolone hypersensitivity. J. Mol. Biol. **309**:1219-1231.

75. **Heisig, P.** 1993. High-level resistance in a *Salmonella typhimurium* isolate due to alterations in both *gyrA* and *gyrB* genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:367-377.
76. **Heisig, P.** 1994. Mechanismen bakterieller Resistenz gegen Antibiotika. *Arzneimittetherapie (Sonderdruck)*.
77. **Heisig, P. and R. Tschorny.** 1994. Characterization of fluoroquinolone-Resistant Mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1284-1291.
78. **Heisig, P.** 1996. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:879-885.
79. **Heisig, P.** 2001. Inhibitors of bacterial topoisomerases: Mechanisms of action and resistance and clinical aspects. *Planta Med.* **67**:3-12.
80. **Herrero, M. and F. Moreno.** 1986. Microcin B17 blocks DNA replication and induces the SOS system in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **132**:393-402.
81. **Hiasa, H. and K. J. Marians.** 1994. *Biol.Chem.* Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *Biol. Chem.* **269**:32655-32659.
82. **Hiasa, H. and K. J. Marians .** 1996. Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J. Biol. Chem.* **271**:21529-21535.
83. **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.
84. **Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May, and E. Bremer.** 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. Typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569-584.
85. **Hinton, D. M., V. C. Bode.** 1975. Ethidium Binding Affinity of Circular λ Deoxyribonucleic Acid Determined Fluorometrically. The Effect of NaCl Concentration on Supercoiling. *J. Biol. Chem.* **250**:1061-1070.
86. **Hinton, D. M., V. C. Bode.** 1975. Purification of closed circular λ Deoxyribonucleic Acid and Its Sedimentation Properties as a Function of Sodium Chlorid Concentration and Ethidium Binding. *J. Biol. Chem.* **250**:1071-1079.
87. **Hirakawa, H., K. Nishino, T. Hirata, and A. Yamaguchi.** 2003. Comprehensive studies on drug resistance mediated by the over expression

- of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **185**:1851-1856.
88. **Hohman, R., und E. Stahl-Biskup.** 2001. Mikroskopische Drogenmonographien der deutschsprachigen Arzneibücher (Band 3).
 89. **Hooper, D. C., J. S. Wolfson, G. L. McHugh, M. B. Winters and M. N. Swartz.** 1982. Effects of novobiocin, coumermycin A1, clorobiocin and their analogs on *Escherichia coli* DNA gyrase and bacterial growth. Antimicrob. Agents Chemother. **22**:662-671.
 90. **Hooper, D. C.** 1998. Clinical applications of quinolones. Biochem. Biophys. Acta **1400**:45-61.
 91. **Hooper, D. C.** 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clin. Infect. Dis. **31 Suppl 2**:S24-S28.
 92. **Horowitz, D. S., J. C. Wang.** 1987. Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. J. Biol. Chem. **262**:5339-5344.
 93. **Hsieh, L.-S, R. M. Burger and K. Drlica.** 1991a. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP]: changes associated with a transition to anaerobic growth. J. Mol. Biol. **219**:443-450.
 94. **Hsieh, L.-S, J. Rouvière-Yaniv and K. Drlica.** 1991b. Bacterial DNA supercoiled and [ATP]/[ADP] ratio: changes associated with salt shock. J. Bacteriol. **173**:3914-3914.
 95. **Hutter, B.** 2002. Persönliche Mitteilung.
 96. **Jurd, L., A. D. King and U. K. Mihara.** 1971. Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives. Phytochem. **10**:2965-2970.
 97. **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.
 98. **Keller, W.** 1975. Determination of the number of superhelical turns in simian virus 40 by gel electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**:4876-4880.
 99. **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.
 100. **Khodursky, A. B. and N. R. Cozzarelli.** 1998. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. J. Biol. Chem. **273**:27668-27677.

101. **Khodursky, A. B., B. J. Peter, M. B. Schmid, J. DeRisi, D. Botstein, P. O. Brown, and N. R. Cozzarelli.** 2000. Analysis of topoisomerase function in bacterial replikation fork movement: use of DNA Microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:9419-9424.
102. **Kirkegaard, K. and J. C. Wang.** 1985. Bacterial topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J. Mol. Biol.* **185**:625-637.
103. **Kobayashi, N. K., Nishino, K., and A. Yamaguchi.** 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:5639-5644.
104. **Kolter, R., D. A. Siegele, and A. Tormo.** 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:855-874.
105. **Lawrence, LE., P. Wu, 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.
106. **Leenen, PJ. M., B. P. Canono. D. A. Drevets, JS. A. Voerman, and P. A. Campbell.** 1994. TNF- α and IFN- γ stimulate a macrophage precursor cell line to kill *Listeria monocytogenes* in a nitric oxide-independent manner. *The Journal of Immunology.* **153**:5141-5147.
107. **Lehninger Biochemie.** 2001. Nelson.Cox, 3.Auflage
108. **Lewis, R. J., O. M. Singh, C. V. Smith, T. Skarzynski, A. Maxwell, A. J. Wonacott, and D. B. Wigley.** 1996. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J.* **15**:1412-1420.
109. **Lima, C. D., J. C. Wang and A. Mondragon.** 1994. Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* topoisomerase I. *Nature* **367**:138-146.
110. **Liu, L. F. and J. C., Wang.** 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7024-7027.
111. **Lomovskaya, O., and K. Lewis.** 1992. *Emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8938-8942.
112. **Martinez-Martinez, L., F. Fernandez, and E. J. Perea.** 1999. Relationship between haemolysis production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:277-279

113. **Masse, E. and M. Drolet.** 1999. Relaxation of transcription-induced negative supercoiling is an essential function of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **274**:16654-16658.
114. **Maxwell, A.** 1993. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **9**:681-686.
115. **Maxwell, A.** 1997. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* **5**:102-109.
116. **Menzel, R. and M. Gellert.** 1983. Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* **34**:105-113.
117. **Menzel, R. and M. Gellert.** 1987. Modulation of transcription by DNA supercoiling: A deletion analysis of the *Escherichia coli gyrA* and *gyrB* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:4185-4189.
118. **Menzel, R.** 1989. A microtiter plate-based system for the semiautomated growth and assay of bacterial cells for β -galactosidase activity. *Anal. Biochem.* **181**:40-50.
119. **Meyer, C. E.** 1964. Rubradirin, a new Antibiotic. II. Isolation and Characterisation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**:97-109.
120. **Murray R. D. H., S. A. Brown.** 1982. The natural coumarins. Occurrence, chemistry and biochemistry. Wiley, New York Chichester Brisbane Toronto Singabore.
121. **Naber, K. and D. Adam.** 1998. Einteilung der Fluorchinolone. *Chemotherapie J.* **7**:66-68.
122. **Nagakubo, S., K. Nishino, T. Hirata, and A. Yamaguchi.** 2002. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance to *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J. Bacteriol.* **184**:4161-4167.
123. **Nakada, N., H. Gmunder, T. Hirata, and M. Arisawa.** 1994. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by cyclothialidine, a novel DNA gyrase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1966-1973.
124. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1992. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Tentative Guideline M26-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA.
125. **Neumann, S. and A. Quinones.** 1997. Discoordinate gene expression of *gyrA* and *gyrB* in response to DNA gyrase inhibition in *Escherichia coli*. *J. Basic. Microbiol.* **37**:53-69.

126. **Nishino, K., and A. Yamaguchi.** 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183**:5803-5812.
127. **Nishino, K., and A. Yamaguchi.** 2002. EvgA of the two compound signal transduction system modulates production of the *yhiUV* multidrug transporter in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **184**:2319-2323.
128. **Nishino, K., J. Yamada, H. Hirakawa, T. Hirata, and A. Yamaguchi.** 2003. Roles of TolC-Dependent Multidrug Transporters of *Escherichia coli* in Resistance to β -Lactams. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3030-3033.
129. **O'Byrne, C. P., N. Ni Bhriain, and C. J. Dorman.** 1992. The DNA supercoiling sensitive expression of the *Salmonella typhimurium his* operon requires the *his* attenuator and is modulated by anaerobiosis and by osmolarity. Mol. Microbiol. **6**:2467-2476
130. **Ohtsuka, Y., T. Mizushima, T. Miki, and K. Sekimizu.** 1997. Transient DNA Relaxation in *Escherichia coli* induced by Nalidixic Acid. Biol. Pharm. Bull. **20**:467-470.
131. **Orphanidis, G. and A. Maxwell.** 1994. Evidence for a conformational change in the DNA-gyrase complex from hydroxyl radical footprinting. Nucl. Acids Res. **22**:1567-1575.
132. **Osheroff, N., E. R. Shelton and D. L. Brutlag.** 1983. DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. J. Biol. Chem. **258**:9536-9543.
133. **Peng, H. and K. J. Marians .** 1993. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. J. Biol. Chem. **268**:24481-24490.
134. **Peng, H. and K. J. Marians .** 1995. The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. J. Biol. Chem. **270**:25286-25290.
135. **Pettijohn D. E. and O. Pfenninger.** 1980. Supercoils in prokaryotic DNA restrained *in vivo*. Proc. Natl. Sci. USA **77**:1331-1335.
136. **Pettijohn D. E.** 1988. Histone-like proteins and bacterial chromosome structure. J. Biol. Chem. **263**:12793-12796.
137. **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.
138. **Piddock, L. J. V, R. Wise.** 1987. Induction of SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinolones antimicrobial agents. FEMS Microbiol. Lett. **41**:289-294.

139. **Postow, L., N. J. Crisona, B. J. Peter, C. D. Hardy, and N. R. Cozzarelli.** 2001. Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:8219-8226.
140. **Preisler, A., M. A. Mraheil, P. Heisig.** 2004. Novel *gyrA* mutations in *Salmonella typhimurium* VacT, a fluoroquinolone susceptible vaccine strain carrying a *gyrA* Asp-87 to Gly mutation. Eingereicht bei Antimicrob. Agents Chemother.
141. **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**:53-42.
142. **Pruss, G. J., and K., Drlica.** 1986. Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:8952-8956.
143. **Rahmouni, A. R., and R. D., Wells.** 1992. Direct evidence for the effect of transcription on local DNA supercoiling *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **223**:131-144.
144. **Raison, V. J., J. Heilmann, I. Merfort, T. J. Schmidt, F. E. Brock, W. Levem, U. Bomme, und R. Bauer** 2000. Arnika-Arzneipflanze mit Tradition und Zukunft. *Zeitschrift für Phytotherapie.* **21**:39-54.
145. **Raji, A., D. J. Zabel, C. S. Laufer, and R. E. Depew.** 1985. Genetic analysis of mutations that compensate for loss of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Bacteriol.* **162**:1173-1179.
146. **Reece, J. R., A. Maxwell.** 1991. DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**:335-375.
147. **Reusser, F.** 1979. Inhibition of ribosomal and RNA polymerase functions by rubradirin and its aglycone. *J. Antibiot. (Tokyo).* **32**:1186-1192.
148. **Reyes-Domínguez, Y., G. Contreras-Ferrat, J. Ramírez-Santos, J. Membrillo-Hernández, and M. C. Gómez-Eichelmann.** 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* Wild-Type and *rpoS* stationary Phase Cells. *J. Bacteriol.* **185**:1097-1100.
149. **Richardson S. M. H., C. F. Higgins and D. M. J. Lilley.** 1984. The genetic control of DNA supercoiling in *Salmonella Typhimurium*. *EMBO J.* **3**:1745-1752.
150. **Roca, J. and J. C. Wang.** 1994. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favour of two-gate mechanism. *Cell* **77**:609-616.
151. **Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic

- sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
152. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor. New York.
 153. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**:5463-5467.
 154. **Schedletzky, H. and B. Wiedemann.** 1993. Stabilität von ternären Komplexen aus Gyrase-DNA und 4-Chinolonen. *Chemotherapie J.* 2.Jahrgang:24-27.
 155. **Schimana, J., H-P. Fiedler, I. Grorh, R. Süßmuth, W. Beil, M. Walker, and A. Zeek.** 2000. Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* TÜ 6040. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* **53**:779-787.
 156. **Schneider, R., A. Travers, T. Kutateladze, and G. Muskhelishvili.** 1999. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**:953-964.
 157. **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.
 158. **Shaw, K.** 2002. Regulation and Induction of Resistance Genes. (Slide Session). ICAAC.
 159. **Shure, M, D. E. Pulleyblank, and J. Vinograd.** 1977. The problems of eukaryotic and prokaryotic DNA packaging and in vivo conformation posed by superhelix density heterogeneity. *Nuc. Acids Res.* **4**:1183-1205.
 160. **Srivenugopal, K. S., D. Lockshon and D. R. Morris.** 1984. *Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. *Biochemistry* **23**:1899-1906.
 161. **Steck, T. R., R. J. Franco, J.-Y. Wang and K. Drlica.** 1993. Topoisomerase mutations affect the abundance of many *Escherichia coli* proteins. *Mol. Microbiol.* **10**(3):473-481.
 162. **Sternglanz, R., S. DiNardo, K. A. Voelkel, Y. Nishimura, Y. Hirota, K. Becherer, L. Zumstein and J. C. Wang.** 1981. Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:2747-2751.
 163. **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 product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:4767-4771.
164. **Sugino A., N. P. Higgins and N. R. Cozzarelli.** 1980. DNA gyrase subunit stoichiometry and the covalent attachment of subunit A to DNA during DNA cleavage. Nucleic Acids Res. **8**:3865-3874.
165. **Sulavik, M.C., C. Houseweart, C. Cramer, N. Jiwani, N. Murgolo, J. Greene, B. DiDomenico, K. J. Shaw, G. H. Miller, R. Hare, and G. Shimer.** 2001. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:1126-1136.
166. **Theobald U., J. Schimana, H-P., Fiedler.** 2000. Microbial growth and production kinetics of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. Antonie van Leeuwenhoek. **78**:307-313.
167. **Trefzer, A., S. Pelzer, J. Schimana, S. Stockert, C. Bihlmaier, H-P. Fiedler, K. Welzel, A. Vente, and A. Bechthold.** 2002. Biosynthetic gene cluster of simocyclinone, a natural multihybrid antibiotic. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:1174-1182.
168. **Tsai, F. T., O. M. Singh, T. Skarzynski, A. J. Wonacott, S. Weston, A. Tucker, R. A. Pauptit, A. L. Breeze, J. P. Poyser, R. O'Brien, J. E. Ladbury, and D. B. Wigley.** 1997. The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarins inhibitors, clorobiocin. Proteins. **28**:41-52.
169. **Tsao Y.-P., Wu, H.-Y and L. F., Liu.** 1989. Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from *in vitro* studies. Cell **56**:11-118.
170. **Tse Y. and J. C. Wang.** 1980. *E. coli* and *M. luteus* DNA topoisomerase I can catalyze catenation of decatenation of double-stranded DNA rings. Cell **22**:269-276.
171. **Tse-Dinh, Y. C.** 1985. Regulation of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. Nucleic Acids Res. **13**:4751-4763.
172. **Tse-Dinh, Y. C. and J. C. Wang.** 1986. Complete nucleotide sequence of the *topA* gene encoding *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. J. Mol. Biol. **191**:321-331.
173. **Tse-Dinh, Y.-C and R. K. Beran.** 1988. Multiple promoters for transcription of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene and their regulation by DNA supercoiling. J. Mol. Biol. **202**:735-742.
174. **Tsiodras, S.** 2001. Linezoild resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. Lancet **358**:207-208.

175. **Vizan, J. L., C. Hernandez-Chico, I. del Castillo, and F. Moreno.** 1991. The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *EMBO J* **10**:467-476.
176. **Wang, J. C.** 1971. Interaction between DNA and *Escherichia coli* protein omega. *J. Mol. Biol.* **55**:523-533.
177. **Wang, J. C.** 1985. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:665-697.
178. **Wang, J. C.** 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:635-692.
179. **Wang, J. C.** 1998. Moving one DNA double helix through another by a type II topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart. Rev. Biophys.* **31**:107-144.
180. **Weisser, J.** 1988. Moderne 4-Chinolone: Wirkung auf Plasmide und mögliche Resistenzentwicklung. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
181. **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**:21-30.
182. **Wichtl, M.** 2002. Teedrogen und Phytopharmaka (4.Auflage).
183. **Wigley, D.B.,** 1995. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**:185-208
184. **Willmott, C. J., S. E. Critchlow, I. C. Eperon, and A. Maxwell.** 1994. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **242**:351-363.
185. **Willuhn, G.** 1998. in: L. D. Lawson und R. Bauer (Hrsg.), *Phytomedicines of Europe. Chemistry and Biological Activity.* ACS Symposium Series 691, American Chemical Society, Washington Dc. S. 118-132.
186. **Winter, A. G., and L. Willeke.** 1952. Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen, IV. Mitteilung. *Naturwissenschaften.* **39**: 45-46.
187. **Wolters, B., and U. Eilert.** 1981 Antimicrobial substances in callus cultures of *Ruta graveolens*. *Planta Med.* **43**:166-174.
188. **Wood, K. V.** 1990. Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists. *Promega Notes.* **28**:1.
189. **Wood, K. V.** 1998. The chemistry of Bioluminescent Reporter Assays. *Promega Notes* **65**:14-24.

190. **Wu, H. Y., S. Shyy, J. C. Wang and L. F. Liu.** 1988. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* **53**:433-440.
191. **Zechiedrich, E. L. and N. Osheroff.** 1990. Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J.* **9**:4555-4562.
192. **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**:2859-2869.
193. **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.

7 Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BSA	Riderserumalbumin
CCLR	Cell Culture Lysis Reagent
Cipro	Ciprofloxacin
Δ	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gram
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
<i>gyrA</i>	Gen der A-Untereinheit der Gyrase
GyrA	A-Untereinheit der Gyrase
<i>gyrB</i>	Gen der B-Untereinheit der Gyrase
GyrB	B-Untereinheit der Gyrase
Glu	Glucose
h	Stunde
kb	Kilobasenpaar(e)
L	Liter
<i>Luc</i>	Gen der Firefly Luciferase (<i>Photinus pyralis</i>)
M	Molar
mM	Millimolar
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
Moxi	Moxifloxacin
ml	Milliliter
Nal	Nalidixinsäure
Novo	Novobiocin
OD _{nm}	Optische Dichte (Index gibt die Wellenlänge an)
Osm	Osmolalität
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pmol	Pico-Mol
<i>ptopA</i>	Promotor des für Topoisomerase I codierenden <i>topA</i> -Gens
<i>pgyrA</i>	Promotor der A-Untereinheit von Gyrase
RLU	Relative Light Units

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
T _A	Anlagerungstemperatur
t _v	Dauer der Verlängerungsreaktion
T _M	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
<i>tolC</i>	Gen für das TolC-Protein der äußeren Membran
<i>topA</i>	Gen für Topoisomerase I
U	Unit
ÜN	Übernacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

- Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Heisig für die Möglichkeit, in seiner Abteilung diese Dissertation anfertigen zu können. Darüber hinaus möchte ich mich bei ihm für die Betreuung meiner Arbeit und die ständige Hilfsbereitschaft in einer sehr netten Atmosphäre, die ich immer gespürt habe, bedanken.
- Herrn Prof. Dr. Bernd Wiedemann danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung in Bonn den ersten Teil dieser Arbeit anfertigen zu können.
- Herrn Prof. Bernward Bisping danke ich für die Übernahme des Korreferats.
- Allen Mitgliedern der Abteilung insbesondere Sabine Badziong danke ich für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Tatjana Claußen und Priv. Doz. Dr. Wulf Schultze möchte ich für die Hilfe bei der Herstellung der Extrakte danken.
- Antje Schnasse und Fr. Dr. Anke Heisig danke ich für die Sequenzierungen.
- Barbara Körber, Silke Schmidt und Fr. Dr. Nadja Auer danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen.
- Antje Preisler danke ich für die Bereitstellung der Salmonella Stämme.
- Bei Jörn Lenz bedanke ich mich für die Hilfestellung bei Problemen mit der Software.
- Besonders bedanken möchte ich mich bei Thomas Grüger, der durch seine ständige Diskussionsbereitschaft eine echte Bereicherung für meine Arbeit war. Für sein Korrekturlesen der gesamten Arbeit bedanke ich mich sehr.
- Prof. Dr. Lutz Heide, Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen und Priv. Doz. Dr. Thomas Schmidt, Pharmazeutisches Institut, Universität Düsseldorf, danke ich für die Bereitstellung einiger Extrakte und Reinsubstanzen.
- Dank gilt der Pinguinstiftung (Henkel GmbH) für finanzielle Unterstützung im Rahmen eines persönlichen Stipendiums während des ersten Teils des Projekts.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt 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 10.12.2004

Mobarak Abu Mraheil

Lebenslauf

Name: Mobarak Abu Mraheil
geboren: 09.10.1972

Schule

1978 - 1984 Al Naser Grundschule, Gaza
1984 - 1987 Al Yarmouk Realschule, Gaza
1987 - 1990 Al Karmel-Gymnasium, Gaza

Studium

1992 - 1993 Studiumkolleg an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
1993 - 1998 Studium der Biologie an der Universität Bonn mit Schwerpunkten im Hauptstudium in Mikro-, Molekular- und Zellbiologie
1998 - 1999 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie in der Abteilung Pharmazeutische Mikrobiologie unter Anleitung von Prof. Dr. Peter Heisig

Vorträge und Poster

04 / 2001 Teilnahme am Bad Honnef Symposium der Paul-Ehrlich-Gesellschaft zur Resistenzentwicklung, Bonn
09 / 2001 Posterpräsentation auf dem "International Congress and 49th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research"
02 / 2003 Vortrag und Posterpräsentation auf dem "7. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT) 2003"
Den KIT-Posterpreis 2003 gewonnen.
10 / 2003 Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft

Fremdsprachen

Arabisch
Deutsch
Englisch

Interessen

Geschichte und Fußball

