

**Die Rolle von Topoisomerase IV als
Zielstruktur für Inhibitoren in *E. coli* sowie
die Transkriptionskontrolle ihrer
Strukturgene *parC* und *parE***

DISSERTATION

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
im Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Thomas Grüger
aus Düsseldorf

2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Juli 2003 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter 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 Disputation: 12.11.2004

Für meine Eltern

Süß ist die Erinnerung an vergangene Mühen.

(Euripides)

1	Einleitung	1
1.1	DNA-Topologie in der Zelle	1
1.2	Struktur und Funktion von Topoisomerasen	3
1.3	Regulation der Topoisomerase-Aktivitäten in <i>E. coli</i>	4
1.4	Natürliche Inhibitoren von Topoisomerasen	7
1.5	Therapeutische Inhibitoren von Topoisomerasen	9
1.6	Zelluläre Effekte einer Hemmung von Gyrase und Topo IV	11
1.7	Resistenz gegenüber Chinolonen	14
1.8	Kontrolle und Messung der Genexpression	15
1.8.1	Regulation der Transkription	17
1.9	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Bakterienstämme	20
2.1.2	Oligonukleotide	20
2.1.3	DNA-Größenmarker	21
2.1.4	Vektoren	22
2.1.5	Chemotherapeutika	22
2.1.6	Nährmedien	22
2.1.7	Puffer und Lösungen	23
2.1.8	Enzyme	24
2.1.9	Chemikalien	24
2.1.10	Geräte und Material	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Bestimmung der Keimzahl	26
2.2.2	Identifizierung der Bakterien	26
2.2.3	Bestimmung der Generationszeit	26
2.2.4	Reduzierung der Wachstumsrate	27
2.2.5	Untersuchung der Zellmorphologie	27
2.2.6	Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien	28
2.2.6.1	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	28
2.2.6.2	Empfindlichkeitstestung mit Gradienten-Platten	28
2.2.6.3	Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration	29
2.2.6.4	Absterbekinetiken	29
2.2.7	Allgemeines Arbeiten mit RNA	30
2.2.8	Isolierung von Gesamt-RNA	30
2.2.9	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	31
2.2.10	Fluorometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	31
2.2.11	Reinheitsbestimmung von RNA	32
2.2.12	Qualitätsprüfung von RNA	32
2.2.13	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide	32
2.2.14	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32

2.2.15	Quantitative real-time RT-PCR	34
2.2.15.1	cDNA-Synthese	34
2.2.15.2	real-time PCR	35
2.2.15.3	Berechnung der Genexpression	37
2.2.16	Bestimmung von 5' mRNA-Enden	39
2.2.17	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten	40
2.2.18	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA	41
2.2.18.1	Extraktion von DNA-Banden aus Agarosegelen	41
2.2.18.2	Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen	42
2.2.18.3	Reinigung und Konzentrierung von DNA durch Ethanol-fällung	42
2.2.19	Enzymatische Modifikation von DNA	42
2.2.19.1	Restriktionsverdau	42
2.2.19.2	Ligation	43
2.2.20	Entsalzung des Ligationsansatzes	44
2.2.21	Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lysis	44
2.2.21.1	Plasmid-Minipräparation mittels Silicagel-Säulen	44
2.2.21.2	Plasmid-Minipräparation modifiziert nach BIRNBOIM und DOLLY	45
2.2.21.3	Plasmid-Midipräparation	45
2.2.22	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation	46
2.2.22.1	Herstellung kompetenter Bakterien nach der CaCl ₂ -Methode	46
2.2.22.2	Transformation nach der Methode von HANAHAN	46
2.2.22.3	Herstellung elektrokompeter Zellen	47
2.2.22.4	Elektroporation	47
2.2.23	In-vitro-Mutagenese	48
2.2.23.1	Herstellung des rekombinanten Plasmids pMAK705-242	49
2.2.24	Sequenzierung von DNA	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Zelluläre Effekte nach Hemmung von Topoisomerase IV oder Gyrase	51
3.1.1	Charakterisierung der verwendeten Stämme	51
3.1.1.1	Bestimmung von Generationszeiten	51
3.1.1.2	Empfindlichkeit gegenüber Topoisomeraseinhibitoren	52
3.1.2	Wirkung von Fluorchinolonen	54
3.1.2.1	Fluorchinolonwirkung auf exponentiell wachsende Kulturen	54
3.1.2.2	Fluorchinolonwirkung auf teilungsinaktive Kulturen	58
3.1.2.3	Fluorchinolonwirkung in Abhängigkeit von der Wachstumsphase	61
3.1.3	Wirkung von Etoposid	63
3.1.3.1	Herstellung von <i>gyrA</i> ^{S83W} -Mutanten	63
3.1.3.2	Sensitivierung von Wildtyp und <i>gyrA</i> -Mutante für Etoposid	64
3.1.3.3	Auswirkungen einer <i>gyrA</i> ^{S83W} -Mutation auf die Empfindlichkeit gegenüber Etoposid und Ciprofloxacin	64
3.1.4	Wirkung von Rutin	65
3.1.5	Wirkung von Novobiocin	66
3.2	Regulation der Transkription von <i>parC</i> und <i>parE</i>	69
3.2.1	RNA-Isolierung und RNA-Ausbeuten	69

3.2.1.1	RNA-Ausbeute: Schwankungsbreite und Abhängigkeit von der optischen Dichte der Kultur	70
3.2.1.2	RNA-Ausbeute: Einfluss von Topoisomerase-Inhibitoren	71
3.2.1.3	Reinheits- und Qualitätsprüfung der RNA	72
3.2.2	Reverse Transkription	72
3.2.2.1	Effizienz und Effizienzschwankungen	72
3.2.3	Quantifizierende real-time PCR	73
3.2.3.1	Optimierung und Validierung	74
3.2.4	Lokalisierung der Transkriptionsstartpunkte von <i>parC</i> und <i>parE</i>	75
3.2.5	DNA-Bindestellen für Transkriptionsfaktoren	78
3.2.6	Quantifizierung der Genexpression	79
3.2.6.1	Expression von <i>parC</i> und <i>parE</i>	80
3.2.6.1.1	Einfluss der Wachstumsphase	80
3.2.6.1.2	Einfluss des DNA-Überspiralisierungsgrads	81
3.2.6.1.2.1	Effekt durch Novobiocin	82
3.2.6.1.2.2	Effekt durch Kälteschock	83
3.2.6.1.3	Einfluss von Mutationen in Topo IV und Gyrase	85
3.2.6.2	Expression des SOS-Gens <i>recA</i>	86
3.2.6.2.1	Induktion durch Ciprofloxacin	87
3.2.6.2.2	Induktion durch Norfloxacin	89
4	Diskussion	91
4.1	Fluorchinolonwirkung auf teilungsaktive und teilungsinaktive Zellen	92
4.2	Wirkung anderer Inhibitoren auf Gyrase und Topo IV	100
4.2.1	Wirkung von Etoposid	100
4.2.2	Wirkung von Rutin	101
4.2.3	Wirkung von Novobiocin	102
4.3	Regulation der Transkription von <i>parC</i> und <i>parE</i>	105
4.3.1	Transkriptionsstartpunkte und Promotoren	106
4.3.2	Einfluss des DNA-Überspiralisierungsgrads	110
4.3.3	Einfluss von Fluorchinolonen	111
4.3.4	Einfluss von Topoisomerase-Mutationen	112
4.3.5	Einfluss der Wachstumsphase	113
5	Zusammenfassung / Summary	115
6	Literatur	118
7	Verwendete Abkürzungen	137
	Danksagung	139
	Lebenslauf	141

1 Einleitung

1.1 DNA-Topologie in der Zelle

In allen lebenden Organismen spielt die räumliche Organisation der DNA (Topologie) eine essentielle Rolle in zellulären Prozessen wie Zellteilung, Rekombination und Transkription. Freie DNA liegt als rechtsgewundene Doppelhelix vor, wobei sich 10,4 bp auf eine helikale Windung verteilen. In dieser B-Konfiguration besitzt das Chromosom von *Escherichia coli* eine Länge von 1,4 mm bei einer Zellgröße von nur 1 μm Durchmesser und 2 μm Länge (49). Damit die DNA dennoch in der Zelle Platz findet, ist eine etwa 1000fache Kondensation der DNA notwendig. Für diese Komprimierung sind einerseits Wechselwirkungen mit zweiwertigen Kationen und Proteinen, andererseits eine spezielle Topologie der beiden komplementären DNA-Moleküle, die negative Überspiralisierung, verantwortlich.

Ein kovalent geschlossenes DNA-Molekül, wie es das Bakterienchromosom darstellt, besitzt aufgrund der rechtsgängigen (positiven) Doppelhelix eine feste Anzahl an Verknüpfungen der beiden komplementären, ringförmig geschlossenen und umeinander gewundenen DNA-Stränge. Für isolierte DNA in der B-Konfiguration entspricht die Anzahl dieser Verknüpfungen (linking number, Lk) der Anzahl der helikalen Windungen (twisting number, Tw); die DNA befindet sich im energieärmsten, sogenannten relaxierten Zustand. Verringert sich, z. B. infolge einer Temperaturerhöhung, die Verdrillung, d. h. der DNA-Twist, so verteilen sich mehr als 10,4 bp auf eine helikale Windung. Der dadurch entstehenden Torsionsspannung wirkt der DNA-Ring durch eine Krümmung (writhe) der Helixachse aus der Ebene heraus entgegen. Dies führt zur Ausbildung sogenannter negativer Überspiralen (Superhelices) mit einer bestimmten Anzahl an Windungen der Superhelix (writhing number, Wr ; Abb. 1-1). Erhöht sich hingegen der DNA-Twist, bildet sich entsprechend eine positive Überspiralisierung aus.

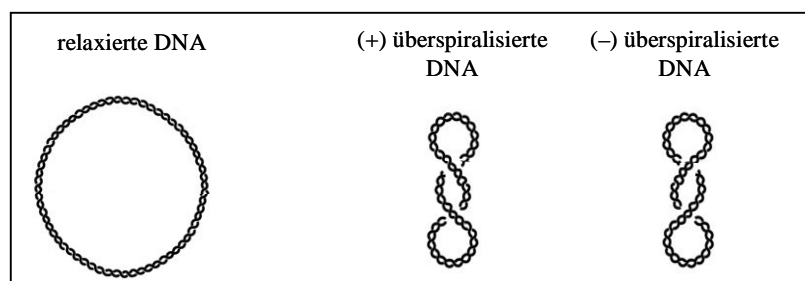


Abbildung 1-1: Überspiralisierung eines DNA-Moleküls, relaxierte zirkuläre DNA ($Wr = 0$), (+) überspiralisierte ($Wr = +2$) und (-) überspiralisierte DNA ($Wr = -2$)

Die Topologie der DNA wird demnach durch die Anzahl an Superhelices (writhing number, W_r) und Verdrillungen (twisting number, T_w) bestimmt, die sich zusammen durch die Verknüpfungszahl (linking number, L_k) gemäß $L_k = T_w + W_r$ (350) beschreiben lassen.

Obgleich sowohl eine negative als auch eine positive Überspiralisierung zu einer Kondensation der DNA führt, weisen alle bislang untersuchten, mesophilen Organismen eine negativ überspiralisierte DNA auf (53, 116, 356). Neben der räumlichen Komprimierung der DNA hat die negative Überspiralisierung eine weitere biologische Funktion als Form der Energiebereitstellung für alle Vorgänge der temporären Strangtrennung, wie Replikation, Rekombination und Transkription.

Die Aufrechterhaltung eines globalen negativen Überspiralisierungsgrads innerhalb enger Grenzen ist für Zellen sogar essentiell und daher mehrfach reguliert (79, 341). So ist für die Rekombination (233), die Initiation der Replikation (108, 217) und für die Initiation der Transkription einer Vielzahl von Genen (9, 61, 273) ein bestimmter globaler negativer Überspiralisierungsgrad erforderlich. Dieser gewährleistet zudem in Verbindung mit DNA-Bindeproteinen eine so hohe Kondensation der DNA, dass bei einer Zellteilung das bakterielle Chromosom nicht durch die Septumbildung guillotiniert wird (152, 246, 289). Alle Prozesse der DNA-Strangtrennung führen aufgrund der helikalen Struktur der DNA unter Beibehaltung der Verknüpfungszahl kompensatorisch zu lokalen Veränderungen von DNA-Twist und DNA-Überspiralisierung. So verursacht die durch Helicase katalysierte Trennung der beiden komplementären DNA-Stränge vor dem Replikationskomplex einen erhöhten Twist in der noch nicht getrennten DNA. Hierdurch akkumulieren zunächst positive Superhelices, die entfernt werden müssen, um ein weiteres Fortschreiten des Replikationskomplexes zu ermöglichen (82, 343). Bei der Transkription führt die Aktivität der RNA-Polymerase ebenfalls zu einer lokalen Entwindung der beiden DNA-Stränge, wodurch sich unterschiedlich superspiralisierte Domänen ausbilden: Vor der RNA-Polymerase entstehen positive Überspiralen [(+) Superhelices], dahinter negative [(-) Superhelices] (109, 208). Diese lokalen Superhelices müssen ebenfalls ausgeglichen werden, um ein Fortschreiten des RNA-Polymerase-Komplexes zu gewährleisten. Andererseits besitzen solche durch Transkription induzierte, negative Superhelices möglicherweise eine physiologische Funktion, indem sie benachbarte Promotoren aktivieren können (95). Zudem beeinflussen physikalische und chemische Umwelteinflüsse, wie Veränderungen der Temperatur oder des osmotischen Drucks, den Twist und damit den Überspiralisierungsgrad der DNA und erfordern eine entsprechende Kompensation. Die Entfernung von Superhelices zur Aufrechterhaltung eines bestimmten negativen DNA-Überspiralisierungsgrads kann gemäß $L_k = T_w + W_r$ nur durch eine Veränderung der

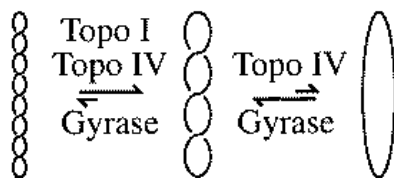
Verknüpfungszahl der DNA erfolgen. Hierzu sind DNA-Strangbrüche erforderlich, die durch Topoisomerasen katalysiert werden.

1.2 Struktur und Funktion von Topoisomerasen

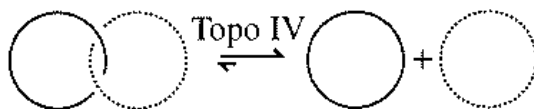
Topoisomerasen sind für alle Zellen essentiell (179, 190, 293), da nur sie in der Lage sind, die dynamischen Veränderungen der DNA-Topologie durch Änderung der Verknüpfungszahl auszugleichen. Topoisomerasen werden in zwei Familien unterteilt, abhängig davon, ob sie eine Strangpassage durch einen vorübergehenden Bruch in einem Strang (Typ I) oder eine Passage eines Doppelstrangs desselben oder eines anderen DNA-Moleküls durch einen vorübergehenden Doppelstrangbruch (Typ II) in der DNA katalysieren. Der Reaktionszyklus der Topoisomerasen beinhaltet die Bildung kovalenter Intermediate, in denen entweder das 5'-Ende (Typ IA, Typ II) oder das 3'-Ende (Typ IB) des geschnittenen DNA-Strangs durch eine Phosphotyrosin-Bindung mit dem Enzym verknüpft ist (52). Typ I-Topoisomerasen benötigen mit Ausnahme von reverser Gyrase (67) keine externe Energiequelle für ihre Aktivität. Typ II Topoisomerasen benötigen hingegen die Hydrolyse von ATP für Konformationsänderungen im Protein und für die Strangpassage, nicht jedoch für die DNA-Spaltungsreaktion (16, 205). *E. coli* besitzt jeweils zwei verschiedene Typ IA (Topoisomerase I und III) und Typ IIA Enzyme (Topoisomerase II oder Gyrase und Topoisomerase IV), die in der Zelle unterschiedliche, teilweise auch überlappende Aufgaben übernehmen. Drei dieser vier Topoisomerasen sind hauptsächlich an der Regulation des Überspiralisierungsgrads und der DNA-Topologie beteiligt ([365], Abb. 1-2): Topoisomerase I (Topo I), Gyrase und Topoisomerase IV (Topo IV).

Topo I ist ein Monomer, das durch *topA* codiert wird und bevorzugt an einzelsträngige DNA

A Supercoils



B Catenane



C Knoten

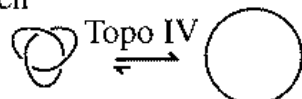


Abbildung 1-2: Topologische Formen der DNA, modifiziert nach Deibler et al. 2001 (74). Eine einzelne Linie repräsentiert die DNA-Doppelhelix. Die topologischen Formen der DNA können nur durch DNA-Strangbrüche verändert werden. (A) In *E. coli* führt Gyrase negative Superhelices (supercoils) in die DNA ein, während Topo I und Topo IV negative Superhelices relaxieren (229, 365). Topo I relaxiert DNA partiell und Topo IV annähernd vollständig (365). (B) DNA-Catenane sind zwei (oder mehr) miteinander verbundene DNA-Ringe. Topo IV trennt Catenane, die durch die Replikation oder Rekombination *in vivo* entstehen (1, 364, 366). (C) Ein Knoten ist die Verwicklung eines einzelnen DNA-Moleküls. Topo IV entknotet DNA *in vivo* (74).

bindet (343). Ihre Hauptfunktion besteht in der Relaxierung von lokalen negativen Superhelices, die während der Transkription entstehen (220). Auf diese Weise verhindert Topo I die Bildung von „R-Loops“, d. h. von RNA-DNA Hybriden mit einem ungepaarten nichtcodierenden Strang (219). Gyrase ist als einziges bekanntes Enzym in der Lage negative Superhelices in die DNA einzufügen (114) und ist daher zur Erhaltung eines negativen Überspiralisierungsgrads essentiell. Unter den Topoisomerasen in *E. coli* kommt die umfangreichste Funktion jedoch Topo IV zu. Topo IV und Gyrase bestehen als Heterotetramere aus je zwei A- und B-Untereinheiten. Die A-Untereinheiten (GyrA in Gyrase bzw. ParC in Topo IV) beinhalten das aktive Zentrum, das den temporären Strangbruch und die Religation katalysiert, während die B-Untereinheiten (GyrB bzw. ParE) durch Hydrolyse von ATP die für die Strangpassage und Religation notwendigen Konformationsänderungen katalysieren. Topo IV relaxiert positive Superhelices etwa 20mal schneller als negative und unterstützt Gyrase bei der Entfernung positiver Superhelices, die z. B. vor einer voranschreitenden Replikationsgabel entstehen (46, 71). Topo IV relaxiert zudem positive „Preactenane“ (Vorstufen von verknüpften Chromosomen), die hinter der Replikationsgabel entstehen (267) und katalysiert am Ende der Zellteilung die Trennung (Decatenierung) von Tochterchromosomen, die zunächst wie Glieder einer Kette (lat. „catena“) verknüpft (cateniert) sind (272, 365). Obgleich Topo IV bevorzugt positive Superhelices relaxiert, unterstützt sie Topo I bei der Relaxierung negativer Superhelices. Sie relaxiert diese zwar nur mit 6fach geringerer Rate als Topo I, vermag dafür aber die DNA nahezu vollständig zu relaxieren (Abb. 1-2, [365]). Topoisomerase III (Topo III) ist wie Topo I ein Monomer, gehört ebenfalls zur Typ IA-Unterfamilie (78) und katalysiert möglicherweise die Entknotung einzelsträngiger DNA, die während der Replikation oder der RecA-vermittelten DNA-Rekombination entsteht (369) Zellen, denen Topo III fehlt, sind zwar lebensfähig, zeichnen sich aber durch eine erhöhte Rate spontaner Deletionen von chromosomaler DNA aus (298, 342, 344).

1.3 Regulation der Topoisomerase-Aktivitäten in *E. coli*

Die dynamischen Veränderungen des globalen und lokalen Überspiralisierungsgrads in der Zelle erfordern eine aufeinander abgestimmte Aktivität der verschiedenen Topoisomerasen, um einen gleichmäßigen Überspiralisierungsgrad aufrecht zu erhalten. Die Aktivitäten von Topo I, Gyrase und Topo IV werden hierzu hauptsächlich auf zwei Ebenen reguliert: Enzymaktivität und Enzymexpression. Die Aktivität der einzelnen Enzyme ist vom Überspiralisierungsgrad der DNA abhängig (siehe Abb. 1-2A). So ist die Prozessivität von Topo I auf negativ überspiralisierte DNA beschränkt und nimmt mit steigendem Überspiralisierungsgrad zu (220,

312). Als molekulare Ursache werden dabei Unterschiede in der Affinität des Enzyms zum jeweiligen Topoisomer vermutet (317). Gyrase und Topo IV zeigen ihre höchste katalytische Aktivität hingegen an positiv überspiralisierter DNA, während sie nur geringe oder keine Aktivität an negativ überspiralisierter DNA besitzen (264, 316). Diese reziproke Regulation der Enzymaktivitäten von Gyrase und Topo IV einerseits und Topo I andererseits findet sich auch auf Ebene der Transkription. Eine Relaxierung der DNA verursacht eine erhöhte Transkription der Gyrasegene *gyrA* und *gyrB* (229), während eine zunehmende negative Überspiralisierung zu einer erhöhten Transkription des für Topo I codierenden *topA*-Gens führt (327). Die Regulation des negativen Überspiralisierungsgrads durch diese Veränderungen in Enzymaktivität und Transkription wurde von Menzel und Gellert als homöostatische Kontrolle bezeichnet (229). Diese homöostatische Kontrolle gewährleistet eine rasche Regulation bzw. Anpassung des DNA-Überspiralisierungsgrads an veränderte Umweltbedingungen und hält diesen innerhalb enger Grenzen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass diese homöostatische Kontrolle zu etwa 72 % auf Ebene der Enzymaktivität und zu 28 % auf Ebene der Genexpression stattfindet (312). Die überspiralisierende Aktivität von Gyrase, die unter ATP-Hydrolyse abläuft, wird nicht nur durch den Überspiralisierungsgrad der DNA, sondern auch durch das ATP/ADP Verhältnis in der Zelle beeinflusst. Ein verringertes ATP/ADP Verhältnis, z. B. unter Nährstoffmangel, führt zu einer geringeren Aktivität von Gyrase und daher zu einer globalen Relaxierung der DNA. Ein erhöhtes ATP/ADP Verhältnis z. B. nach einem Salz- oder Hitzeschock verursacht eine stärkere Überspiralisierung (50, 159).

Die Regulation von Topo IV auf der Ebene der Genexpression ist bislang in *E. coli* nicht untersucht. Die Funktion dieses Enzyms für die Relaxierung positiver aber auch negativer Superhelices sowie für die Zellteilung (s. o.) lässt es möglich erscheinen, dass der Überspiralisierungsgrad oder die Phase des Zellzyklus die transkriptionale Regulation beeinflusst.

In dem Bakterium *Caulobacter crescentus* konnte eine vom Zellzyklus abhängige Transkription der Topo IV-Gene gezeigt werden (347). Neueste Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Kenneth Mariani zur Interaktion von Topo IV mit der Replikationsmaschinerie in *E. coli* zeigen, dass die solitäre Untereinheit ParC über die meiste Zeit des Zellzyklus an die Replikationsmaschinerie gebunden ist, während ParE in DNA-freien Regionen des Zytoplasmas anzutreffen ist. Die Aktivität von Topo IV manifestiert sich daher erst, nachdem die beiden Untereinheiten ParC und ParE fusioniert haben, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Replikation fast abgeschlossen ist (93). Es wurde ferner eine physische Interaktion zwischen Topo IV und der C-terminalen Domäne von FtsK (filamenting temperature sensitive)

nachgewiesen (93), einem Protein, das an der Septenbildung beteiligt ist (346). Eine entsprechende Lokalisierung von ParC und Topo IV an den Septen bzw. Zellpolen und von ParE im gesamten Zytoplasma wurde auch in *Bacillus subtilis* nachgewiesen (161). Die kürzlich festgestellte Interaktion von Topo IV mit SeqA (176) bestätigt die Bindung von Topo IV an die Replikationsmaschinerie. SeqA bindet an die neu replizierte, hemimethylierte *oriC*-Sequenz und verhindert eine erneute Initiation der Replikation während des ersten Drittels des Zellzyklus (36, 306). Da die hemimethylierten Tochterstränge durch SeqA gebunden werden (40) und Topo IV in Zellen, denen SeqA fehlt, möglicherweise vor der Replikationsgabel lokalisiert ist (182), postulierten Kang und Mitarbeiter, dass SeqA zur Lokalisierung von Topo IV hinter der Replikationsgabel beiträgt und somit die Relaxierung von „Precatenanen“ und die Decatenierung der Tochterchromosomen stimuliert (176).

Gyrase und Topo I unterliegen einer weiteren Regulation auf Transkriptionsebene, die in Abhängigkeit von Temperaturveränderungen eine erhöhte Transkription ermöglicht. Während die Transkription von *gyrA* und *gyrB* durch bestimmte Kälteschock-Proteine etwa 2 h nach einem raschen Temperaturabfall stimuliert wird (173) besitzt *topA* einen σ^{32} -Promotor, der durch einen Hitzeschock aktiviert wird (198, 274). Diese Regulation ermöglicht die Relaxierung von übermäßig negativ überspiralisierter DNA nach einem Hitzeschock bzw. die Kompensation der DNA-Relaxierung nach einem Kälteschock (siehe 1.1). Die Transkription von *gyrA* wird zusätzlich durch das cAMP Rezeptorprotein (CRP), einem globalen Transkriptionsfaktor, positiv stimuliert, wenn hohe cAMP-Konzentrationen (z. B. bei Glucosemangel) vorhanden sind (118).

Mutationen in den Topoisomerasegenen, die zu einer Beeinträchtigung oder gar zum Verlust der Enzymaktivität führen, sind meist mit einem veränderten Überspiralisierungsgrad, verlangsamtem Wachstum oder einem Verlust der Zellteilungsfähigkeit (Par-Phänotyp) verbunden (15). Für Topo IV wurde gezeigt, dass zudem eine ungestörte Interaktion der beiden A- und B-Untereinheiten essentiell für die Enzymfunktion ist. So konnte für die Mutationen *parE*^{G110S}, *parE*^{S123L} und *parE*^{T201A} eine Beeinträchtigung der Religation mit der Folge einer überhöhten Rate von DNA-Strangbrüchen nachgewiesen werden, während die Mutationen *parE*^{E418K}, *parE*^{G419D} und *parE*^{G442D} die Ausbildung des kovalenten Intermediats zwischen Enzym und DNA verhinderten (235, 249). Beide Mutationstypen verursachten einen Par-Phänotyp. Aufgrund der partiell überlappenden und entgegengesetzten zellulären Funktionen der Topoisomerasen können Aktivitätsverluste einer Topoisomerase teilweise durch Veränderungen der Aktivität einer anderen Topoisomerase kompensiert werden. Wird *topA* in einem *E. coli*-Stamm deletiert, so verliert dieser die relaxierende Aktivität von Topo I und ist

nur lebensfähig, wenn die Aktivität des Gegenspielers Gyrase durch Mutationen, z. B. in *gyrB*, eingeschränkt wird (134), oder eine Genduplikation von *parC* und *parE* zu einer höheren Aktivität von Topo IV führt (178, 276). Eine verstärkte Expression von Topo III kann ebenfalls einen Funktionsverlust von Topo I kompensieren (43).

1.4 Natürliche Inhibitoren von Topoisomerasen

Aufgrund ihrer essentiellen Funktion in der bakteriellen Zelle sind Topoisomerasen geeignete Zielstrukturen für die antibakterielle Therapie, und sowohl die Natur als auch die pharmazeutische Industrie haben sich dies zunutze gemacht. Inhibitoren können die Funktion der Topoisomerasen derart einschränken, dass dies zu Wachstumsdefiziten oder gar einer letalen Zellschädigung führt. Entsprechend ihrem Wirkungsmechanismus werden zwei Arten von Topoisomerase-Inhibitoren unterschieden: katalytische Inhibitoren und irreversible Inhibitoren, die auch als „topoisomerase poisons“ bezeichnet werden (107), da sie ein Intermediat im Reaktionszyklus dauerhaft stabilisieren und dadurch eine langanhaltende Fixierung der Topoisomerasen an die DNA verursachen (siehe 1.6).

Inhibitoren der bakteriellen Topo I- und Topo III-Enzyme sind weitgehend unbekannt. Erst kürzlich wurden in einem umfangreichen Screening wenige Substanzen entdeckt, die durch Hemmung von Topo I eine bakterizide Wirkung vermitteln (97). Demgegenüber sind zahlreiche natürliche und synthetische Verbindungen bekannt, die Gyrase und teilweise auch Topo IV hemmen und dadurch eine antibakterielle Aktivität ausüben. Natürlicherweise werden solche Inhibitoren von einigen Pilz- und Bakterienarten, wahrscheinlich als Schutz vor Nahrungskonkurrenten, und von den meisten Pflanzenarten, möglicherweise als Schutz vor Infektionen, produziert. Die von *Streptomyces* sp. produzierten Aminocumarine (Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁) und Cyclothialidine sind katalytische Inhibitoren. Sie binden unterschiedlich an die B-Untereinheiten von Gyrase und im Falle der Cumarine auch von Topo IV und verhindern jeweils die Bindung von ATP (240, 241, 258, 263), das für die superspiralisierende Aktivität von Gyrase bzw. decatenierende Aktivität von Topo IV erforderlich ist. In *E. coli* hemmen Cumarine primär Gyrase, was zu einer Relaxierung der DNA und einem Verlust der Fähigkeit zur Koloniebildung führt (261, 287). Zu den als „topoisomerase poisons“ (s. o.) bezeichneten Inhibitoren von Gyrase zählt das von verschiedenen Pilzarten wie *Fusidium viridae* oder *Oidiodendron*- und *Kitasatosporia*-Arten produzierte Terpenoid-Antibiotikum Clerocidin (226) sowie das von *Nocardia* sp. produzierte Glycocinnamoylspermidin Cinodin (260). Einige der in vielen Pflanzenarten enthaltenen Flavone, wie z. B. Rutin (Abb. 1-3), wirken ebenfalls als „topoisomerase poisons“ von Gyrase und Topo IV (26,

148) und könnten somit als Schutz vor Infektionen dienen. Darüber hinaus werden von *E. coli* und anderen Bakterienarten zahlreiche plasmid- oder chromosomal-codierte Polypeptide synthetisiert, die als „topoisomerase poisons“ wirken. So produzieren einige *E. coli*-Stämme, die das Plasmid pMccB17 oder ein Derivat davon besitzen, den Inhibitor Microcin B17 (43 Aminosäuren), der ausgeschleust wird und durch Aufnahme von anderen Stämmen dort die Gyrase irreversibel hemmt (140, 335). Das vom F-Plasmid codierte CcdB (control of cell death) (27, 28, 168) und möglicherweise das von RK2- und RP4-Plasmiden codierte ParE-Toxin (172) sind jeweils Teil eines plasmidcodierten Toxin-Antitoxin-Systems, das der Stabilisierung der Plasmide in der Zelle dient. Die meist instabileren Antitoxine (z. B. CcdA bzw. ParD) müssen in ausreichender Menge exprimiert werden, um die stabileren Toxine (CcdB bzw. ParE) durch Komplexbildung abzufangen. Unterbleibt bei der Zellteilung die Weitergabe des Plasmids an die Tochterzelle, so fehlt eine ausreichende Menge Antitoxin, und das vorhandene Toxin führt durch Hemmung von Gyrase zum Zelltod oder zur Hemmung der Zellteilungsfähigkeit (168, 171).

Weitere Inhibitoren der zelleigenen Gyrase werden von Bakterien produziert, um diese möglicherweise vor zytotoxischen Inhibitoren zu schützen oder die Enzymaktivität zusätzlich zu regulieren. Einen solchen Inhibitor stellt womöglich MurI dar. MurI ist eine Glutamat-Racemase, die nur während der Peptidoglykan-Synthese aktiv ist. Als Aktivator fungiert UDP-MurNAc-L-Ala (80). Eine Gyrasehemmung durch MurI konnte *in vitro* gezeigt werden (12). Es wird postuliert, dass die Hemmung von Gyrase durch MurI während der frühen Phase der Septumbildung das Auftreten einer abnormalen DNA-Replikation und Decatenierung infolge einer übermäßigen Gyrase-Aktivität verhindert (12). Ein weiterer chromosomal codierter Inhibitor der A-Untereinheit von Gyrase in *E. coli* ist SbmC. Dieses Protein vermittelt einerseits einen Schutz gegenüber Microcin B17, CcdB und Chinolonen (55), andererseits auch eine Resistenz gegenüber den DNA-schädigenden Substanzen Mitomycin C und N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) (56, 349). Chatterji und Mitarbeiter postulieren daher eine zusätzliche indirekte Funktion von SbmC, indem durch die Hemmung von Gyrase die Replikationsmaschinerie derart verlangsamt wird, dass der Zelle mehr Zeit für eine Reparatur von DNA-Schäden verbleibt (56). Die Expression des *sbmC*-Gens wird in der stationären Wachstumsphase einer Batchkultur und bei Induktion des SOS-Regulons (siehe 1.6) erhöht (20, 242, 253). Drei weitere Proteine (McbG, MfpA und Qnr) aus der „Pentapeptid-repeat“-Familie vermitteln jeweils einen Schutz von Gyrase gegenüber zytotoxischen Inhibitoren. McbG gehört zu den Proteinen, die zusammen mit Microcin B17 (s. o.) produziert werden. Es vermittelt eine geringe Resistenz gegenüber einigen Inhibitoren von Gyrase (z. B. dem Fluorchinolon

Sparfloxacin) und schützt in Stämmen, die Microcin B17 produzieren, wahrscheinlich deren eigene Gyrase (112). Das Gen *mfpA* (mycobacterial fluoroquinolone-resistance pentapeptide) wurde im Chromosom von *Mycobacterium smegmatis* gefunden, codiert für ein Protein von 192 Aminosäuren und weist eine hohe Homologie zu McbG (188 Aminosäuren) auf (234). Sequenzvergleiche zeigten, dass *mfpA*-homologe Gene auch in anderen Bakterien wie *Treponema pallidum*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia prowazekii*, *Bacillus megaterium*, und *Synechocystis* sp. existieren (234). Qnr ist ein Protein, das in einem *Klebsiella pneumoniae*-Stamm vom Plasmid pMG252 codiert wird und eine 4-8fache Resistenz gegenüber einigen Chinolonen und Fluorchinolonen vermittelt (326). *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass Qnr nur Gyrase, nicht aber Topo IV vor einigen Fluorchinolonen schützt (326).

Ein weiterer Schutzmechanismus vor zytotoxischen Topoisomeraseinhibitoren besteht in der Produktion einer zusätzlichen unempfindlichen Form von Topoisomerase. So schützen *Streptomyces* sp., die Aminocumarine produzieren, ihre eigene Gyrase, indem sie eine zusätzliche resistente GyrB-Untereinheit produzieren (115, 294, 324).

1.5 Therapeutische Inhibitoren von Topoisomerasen

Erst die Identifizierung von Gyrase als Zielstruktur für die synthetischen Chinolone im Jahr 1977 (113, 320) erlaubte es, die Rolle von Topoisomerasen als wichtige therapeutische Zielstrukturen zu erkennen (58, 222). Chinolone und die an Position C-6 fluorierten Fluorchinolone (z. B. Ciprofloxacin, Abb. 1-3) haben als potente Inhibitoren von Gyrase und Topo IV eine große Bedeutung in der Therapie von bakteriellen Infektionskrankheiten erlangt. Zudem werden in der Tumorthherapie zahlreiche natürliche und synthetische Inhibitoren eukaryontischer Topoisomerasen eingesetzt, die anderen Wirkstoffklassen, wie den Acridinen, Anthracyclinen, Ellipticinen, Camptothecinen und Epipodophyllotoxinen (z. B. Etoposid, Abb. 1-3) zugeordnet werden.

Die meisten Chinolone zeigen nur eine geringe Wirkung auf eukaryontische Typ II Topoisomerasen (Topo II-Enzyme). Für eine Hemmung sind bis zu 1000fach höhere Konzentrationen notwendig. Es gibt jedoch auch Chinolonderivate wie CP-115,953 (Abb. 1-3), die *in vitro* eukaryontische Topo II-Enzyme effizient hemmen (4). Andererseits können Inhibitoren von Topo II-Enzymen – zumindest *in vitro* – auch eine Hemmung von Gyrase und Topo IV vermitteln (5, 203). Ursächlich hierfür ist vermutlich die hohe strukturelle und funktionelle Homologie von eukaryontischen Typ II Topoisomerasen zu bakterieller Gyrase bzw. Topo IV. Da Topo II-Enzyme keine negativen Superhelices in die DNA einführen können, weisen sie funktionell eine höhere Homologie zu Topo IV auf. Bezüglich der Interaktion

zwischen Inhibitoren und Enzym scheint jedoch eine höhere Homologie zu Gyrase zu bestehen (4, 127).

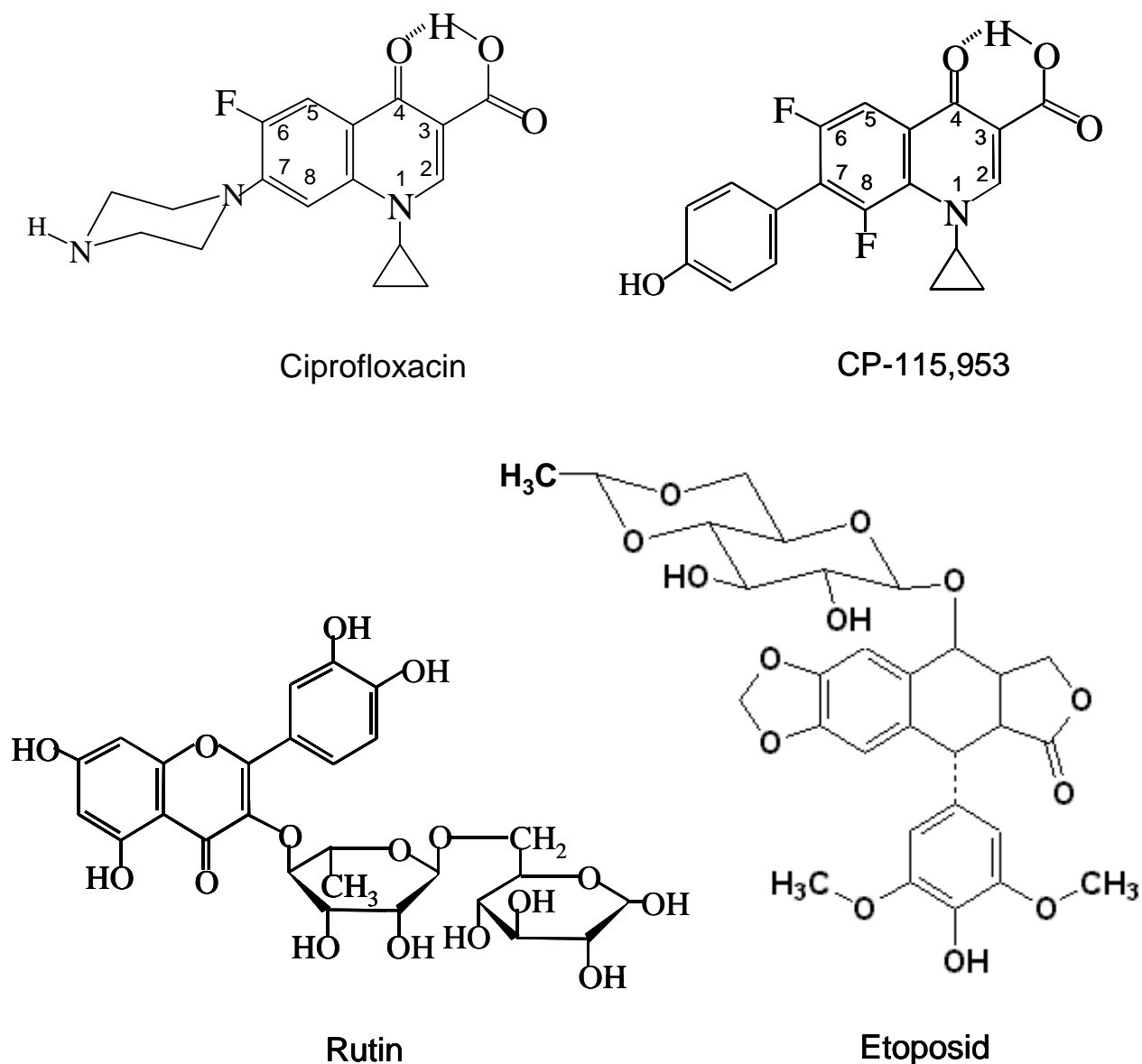


Abbildung 1-3: Chemische Struktur einiger irreversibler Inhibitoren von Typ II Topoisomerasen

Da bakterielle Typ II Topoisomerasen je nach Bakterienspezies strukturelle Unterschiede aufweisen, ist auch die Affinität von Chinolonen und anderen Inhibitoren zu diesen Enzymen unterschiedlich. In gramnegativen Spezies der Gattung Enterobacteriaceae, wie z. B. *E. coli*, besitzen die bisher bekannten Chinolone eine höhere Affinität zu Gyrase als zu Topo IV (135, 184, 290). Demgegenüber ist Gyrase in grampositiven Spezies wie *S. aureus* gegenüber den meisten dieser Inhibitoren unempfindlicher als Topo IV, so dass diese die primäre, d. h. empfindlichere Zielstruktur darstellt (101, 153). Die Affinität wird jedoch auch durch die

Inhibitorstruktur bestimmt. Ältere Chinolone weisen deutliche Unterschiede in ihrer relativen Affinität zu Gyrase bzw. Topo IV auf, während neuere Chinolone annähernd gleiche Affinitäten für beide Zielstrukturen zeigen (153) und daher als Dual-Target-Inhibitoren bezeichnet werden. Die Bindungsaffinitäten (gemessen als Konkurrenz mit [³H] Norfloxacin) von Chinolonen und Flavonen zur Gyrase von *E. coli* nehmen z. B. in der Reihenfolge Moxifloxacin > Levofloxacin = Ciprofloxacin > Ofloxacin > Norfloxacin > Flavon-Verbindungen (u. a. Ellaginsäure und Quercetin) ab und korrelieren mit der antibakteriellen Potenz der Inhibitoren (148, 290, 362). Für das Chinolon Gemifloxacin wurde eine derart hohe Affinität zur Gyrase von *S. pneumoniae* festgestellt, dass Gyrase in diesem grampositiven Keim die primäre Zielstruktur für Gemifloxacin bildet (132).

1.6 Zelluläre Effekte einer Hemmung von Gyrase und Topo IV

Entsprechend ihrem Wirkungsmechanismus werden zwei Arten von Inhibitoren der Typ II Topoisomerasen unterschieden: katalytische Inhibitoren und irreversible Inhibitoren oder sogenannte „topoisomerase poisons“.

Katalytische Inhibitoren wie Cumarine und Cyclothialidine hemmen die Enzymaktivität, indem sie die Bindung von ATP durch Besetzung der Bindungsstelle verhindern (siehe 1.4). Die katalytische Hemmung von Gyrase oder Topo IV durch Inhibitoren oder durch bestimmte Mutationen in *gyrB* oder *parE*, verursachen eine Zunahme der Torsionsspannungen der DNA vor der Replikationsgabel, so dass diese nicht weiter fortschreiten kann, oder stark verlangsamt wird (123, 183).

Demgegenüber stabilisieren „topoisomerase poisons“ wie Chinolone, Flavone und Epipodophyllotoxine einen Zustand im Reaktionszyklus des Enzyms, in dem die DNA geschnitten und mit ihrem 5'-Phosphat über einen Tyrosinrest kovalent an das Enzym gebunden ist. Die Stabilisierung des Intermediats erfolgt vermutlich dadurch, dass diese Inhibitoren zunächst die DNA-Doppelhelix in der Nähe der Schnittstelle deformieren (216) und dadurch die Interaktion zwischen DNA und Enzym stören. Hierdurch wird die DNA in Abhängigkeit von ihrer Sequenz zu einem bevorzugten Substrat für die Spaltungsreaktion des Enzyms, und die Bindung der Inhibitoren verhindert zudem eine Religation der DNA-Enden (4). Dieses als „positional poison model“ bekannte Modell der Chinolonwirkung (185) wird durch zahlreiche Untersuchungen gestützt (45, 51, 104). Verschiedene Inhibitoren (z. B. verschiedene Chinolone) verursachen ein jeweils spezifisches Schnittmuster (5, 203, 259, 319), das mit der zytotoxischen Wirkung dieser Inhibitoren korreliert (247). Die gebildeten ternären Komplexe aus Inhibitor, Enzym und DNA, die auch als spaltbare Komplexe („cleavable complexes“) bezeichnet werden

(207), da nach einer Behandlung mit Protein-denaturierenden Agenzien geschnittene DNA freigesetzt wird, stellen eine Barriere für replikative Helicasen (142, 303) und RNA-Polymerasen (354) dar.

Die zellulären Auswirkungen einer Hemmung der Typ II Topoisomerasen sind von der gehemnten Zielstruktur, dem Inhibitor und von der Zellphysiologie abhängig. Die Hemmung von Gyrase durch katalytische Inhibitoren wie Cumarine oder „topoisomerase poisons“ (z. B. Chinolone) verursacht in *E. coli* zunächst eine rasche Reduktion der DNA-Synthese (120, 130, 183, 305). Die selektive Hemmung von Topo IV durch Chinolone sowohl in *E. coli* als auch in *S. aureus* bewirkt jedoch eine nur langsame Reduktion der DNA-Synthese (101, 184). Ursächlich für diese langsame Reduktion ist vermutlich die bevorzugte Lokalisierung von Topo IV hinter der Replikationsgabel (siehe 1.3), die geringere Anzahl von Topo IV- im Vergleich zu Gyrase-spezifischen Schnittstellen im Bakterienchromosom (60, 150) und die geringere Bedeutung von Topo IV für die Elongation der Replikation (183). Unabhängig von der Zielstruktur korreliert jedoch eine 50%ige Hemmung [IC₅₀] der DNA-Synthese durch Chinolone und Cumarine sowohl in grampositiven als auch in gramnegativen Bakterienspezies mit der minimalen Hemmkonzentration (MHK), die über 18 h ein sichtbares Wachstum verhindert (22, 60, 149).

Charakteristisch für die Chinolonwirkung nach Hemmung von Gyrase oder Topo IV ist die Induktion der SOS-Antwort in wachsenden, teilungsaktiven Kulturen (182). Durch diese Induktion von etwa 30 auf transkriptionaler Ebene regulierter Operons (69, 180) wird die Zellteilung verhindert und die Produktion von DNA-Reparaturenzymen verstärkt (337). Bei uneingeschränktem Wachstum führt der Zellteilungsstopp infolge dieser SOS-Antwort zu einer Filamentierung der Zellen. Eines der SOS-Proteine, RecA, fungiert als Sensor für DNA-Schäden. Durch Bindung an einzelsträngige DNA, wie sie an zerfallenden Replikationsgabeln vorliegt, wird die Coproteasefunktion von RecA aktiviert, wodurch es zur Spaltung des Repressors LexA kommt. Die sinkende Konzentration von LexA führt zur Derepression der SOS-Gene (206). Nach Reparatur der DNA-Schäden sinkt die Konzentration an aktiviertem RecA, LexA akkumuliert und reprimiert wieder die SOS-Operons, so dass die Zelle in ihren ursprünglichen Status zurückkehrt. Je nach Grad der DNA-Schädigung werden die Gene im SOS-Regulon unterschiedlich stark dereprimiert (11, 295). Untersuchungen zur Induktion verschiedener SOS-Gene nach Hemmung von Gyrase oder Topo IV durch Chinolone zeigten eine Abhängigkeit vom verwendeten Chinolon und dessen Konzentration, jedoch keine Korrelation mit dem Verlust der Zellteilungsfähigkeit oder der MHK, zumal eine Induktion bereits bei subinhibitorischen Konzentrationen erfolgte (37, 182, 268, 270). Möglicherweise

verursacht die Hemmung von Topo IV eine etwas geringere Induktion der SOS-Antwort als die Hemmung von Gyrase (182). Obwohl wenige Untersuchungen darauf deuten, dass die SOS-Antwort an den zytotoxischen Effekten einer Fluorchinolonwirkung beteiligt ist (339), überwiegen die Studien, die nach einer Hemmung von Gyrase oder Topo IV eine Verringerung dieser Effekte durch SOS-induzierte Reparaturmechanismen zeigen (60, 101, 157, 182). Neben den SOS-induzierten Reparaturmechanismen ist die homologe Rekombination maßgeblich an der Reparatur von Chinolon-induzierten DNA-Schäden und an der Wiederaufnahme der DNA-Synthese (Rekombinations-abhängige Replikation) beteiligt (25, 92, 101, 157, 182).

Die zellulären Effekte, die Cumarine neben einem DNA-Synthesestopp (s. o.) durch die Hemmung von Gyrase oder Topo IV verursachen, sind wenig untersucht und werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Untersuchungen an *E. coli* zeigen eine Induktion der SOS-Antwort auch durch Cumarine (225, 307) oder lassen auf eine solche Induktion schließen (44, 309). In einer anderen Studie mit *Haemophilus influenzae* konnte hingegen keine Induktion der SOS-Antwort durch Novobiocin nachgewiesen werden (117).

Darüber hinaus bewirken Cumarine bereits in subinhibitorischen Konzentrationen einen Verlust der Fähigkeit zur Koloniebildung in *E. coli* (202, 261, 287). Eine zytotoxische Wirkung hoher Cumarinkonzentrationen in Form einer Zelllysis konnte zwar auf Archaeobakterien (305) nicht jedoch auf *E. coli* (309) nachgewiesen werden. Demgegenüber bewirken Chinolone in Konzentrationen oberhalb der MHK sowohl in gramnegativen als auch grampositiven Bakterien nicht nur einen Verlust der Fähigkeit zur Koloniebildung, sondern auch eine Zelllysis (72, 91, 336). Für diese zytotoxische Aktivität von Chinolonen werden DNA-Doppelstrangbrüche verantwortlich gemacht (85, 111, 113, 143, 190, 354). Ihre Entstehung, genaue Struktur sowie Reparatur sind trotz intensiver Forschung über mehrere Jahrzehnte noch nicht vollständig verstanden. Neue Studien von Gari et al. (3) zeigen, dass unter der Voraussetzung eines Zellwachstums auch bestimmte Mutationen (*gyrA208*-Allel) sowie ein Thyminmangel bei Thymin bedürftigen (Thy^-) Mutanten (3) zu DNA-Schäden, einer Induktion der SOS-Antwort und zum Zelltod führen, ohne dabei spaltbare Gyrase-DNA Komplexe zu stabilisieren. Es wird daher postuliert, dass jeder Stopp der Replikation bei gleichzeitig uneingeschränktem Wachstum zu einem Zerfall des Replikationsgabelkomplexes, der Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen und zum Zelltod führt (111, 354).

Cumarine verursachen zudem wie Chinolone auch eine temporäre Induktion der Hitzeschock-Antwort, die jedoch die Lebensfähigkeit nicht beeinflusst und möglicherweise infolge eines reduzierten DNA-Überspiralisierungsgrads erfolgt (191, 193).

1.7 Resistenz gegenüber Chinolonen

Die Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber Chinolonen wird durch die Anzahl und Art der gebildeten ternären Komplexe bestimmt sowie die Wahrscheinlichkeit, dass ein solcher Komplex eine replikative Helicase blockiert (siehe 1.6). Die Bildung und Stabilität des Komplexes werden maßgeblich durch die intrazelluläre Konzentration und die Affinität eines Chinolons zu Gyrase oder Topo IV beeinflusst. Der Austausch von Aminosäuren innerhalb der A-Untereinheiten von Gyrase und Topo IV vermindert die Affinität zu Chinolonen, verändert die Sequenzspezifität und damit das DNA-Schnittmuster (319) und führt häufig zu einer zellulären Unempfindlichkeit gegenüber diesen Inhibitoren. Betroffen sind meist die Aminosäuren 83 und 87 in GyrA bzw. 80 und 84 in ParC (Numerierung nach *E. coli*), die in Kombination zu einer klinisch bedeutsamen Resistenz führen (24, 89, 98, 135, 184, 197). Andererseits können solche Resistenzmutationen in *gyrA* zu einer Hypersensitivität des Enzyms gegenüber anderen Inhibitoren wie Etoposid führen (127). Der Austausch anderer Aminosäuren in GyrA, GyrB, ParC und ParE kann ebenfalls die Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen vermindern (21, 39, 63, 105, 133, 266, 360) und weist auf die Beteiligung der A- und B-Untereinheit an der Chinolonbindung hin. Ein weiterer klinisch bedeutsamer Resistenzmechanismus besteht in der Reduktion der intrazellulären Chinolonkonzentration infolge eines erhöhten Effluxes dieser Substanzen durch verschiedene Effluxpumpen (224, 238, 340, 358). Klinisch hochresistente Stämme von *E. coli* weisen meist eine Kombination von Resistenzmechanismen auf, wie eine Doppelmutation in *gyrA* gepaart mit einer Einzelmutation in *parC* und einem erhöhten Efflux (135, 181, 340). Zelleigene Inhibitoren von Gyrase stellen zusätzlich einen gewissen Schutz vor der Wirkung von Chinolonen dar, indem sie eine Bindung dieser Inhibitoren verhindern (siehe 1.4). Da die Wirkung von „topoisomerase poisons“ auf der indirekten Blockierung der replikativen Helicasen und den damit verbundenen Folgeprozessen basiert, ist die zytotoxische Wirkung von Chinolonen stark von der Replikations- bzw. Teilungsaktivität der Zellen abhängig. So zeichnen sich Kulturen mit längerer Generationszeit durch eine verminderte Empfindlichkeit aus (72, 75, 84, 86). Bei fehlendem Zellwachstum, z. B. infolge einer Hemmung der RNA- oder Proteinsynthese oder durch Entzug von Nährstoffen, verursachen Chinolone zwar einen Stopp der DNA-Synthese, induzieren aber nicht die SOS-Antwort und lösen keine zytotoxischen Effekte aus (310). Teilungsinaktive Zellen zeigen daher über mehrere Stunden keinen Verlust ihrer Lebensfähigkeit (218, 352).

Eine geringe zelluläre ATP-Konzentration wirkt ebenfalls negativ auf die Bildung von zytotoxischen DNA-Doppelstrangbrüchen nach der Hemmung der A-Untereinheit von Gyrase

durch Chinolone oder Epipodophyllotoxine und verringert damit die zelluläre Empfindlichkeit gegenüber diesen Inhibitoren (203, 314).

Andere Faktoren, wie die Anzahl von Topoisomerasemolekülen, können die Empfindlichkeit für katalytische Inhibitoren oder „topoisomerase poisons“ entgegengesetzt beeinflussen. Eine verminderte Anzahl an Zielstrukturen verringert die Wahrscheinlichkeit, dass sich ternäre Komplexe mit „topoisomerase poisons“ ausbilden, so dass die Zellen unempfindlicher werden (182, 192, 355). Katalytische Inhibitoren schränken hingegen nur die Enzymfunktion ein, so dass eine verringerte Anzahl von Topoisomerasen zu einem stärkeren Funktionsverlust führt und die Zellen somit sensitiviert werden (76, 166).

1.8 Kontrolle und Messung der Genexpression

Die Kenntnis der Expressionskontrolle der Strukturgene *parC* und *parE* für die A- und B-Untereinheiten von Topo IV ist nicht nur von besonderer Bedeutung für ein besseres Verständnis der zellulären Funktion von Topo IV, sondern auch für das Verständnis der Wirksamkeit von Topoisomerase-Inhibitoren, da die Menge des exprimierten Topo IV-Enzyms die Empfindlichkeit für Topoisomerase-Inhibitoren beeinflusst (siehe 1.7).

Eine Kontrolle der bakteriellen Genexpression findet auf mehreren Ebenen statt. Eine Möglichkeit für eine erhöhte Expression eines Gens besteht in der Duplikation. *E. coli* besitzt sieben homologe rRNA-Gene, um den hohen Bedarf an ribosomaler RNA bei hohen Wachstumsraten zu decken, und Duplikationen von *parC* und *parE* können als kompensatorische Mutationen einen Verlust von *topA* ausgleichen (siehe 1.3). Ein weiterer Kontrollmechanismus bildet die Stabilität der mRNA eines Gens (29, 126) und das Ausmaß der Komplementarität der Ribosomenbindungsstelle (RBS) zu entsprechenden Sequenzbereichen der 16S rRNA. Beide Faktoren haben entscheidenden Einfluss darauf, wie häufig eine mRNA translatiert wird. Eine weitere Form der posttranskriptionalen Regulation ist die Destabilisierung von Sekundärstrukturen in mRNAs bei niedrigen Temperaturen durch Kälteschock-Proteine der CspA-Familie (248). Die Stabilität und mögliche posttranslationale Modifikationen des Proteins beeinflussen ebenfalls die Menge an aktivem Protein in der Zelle. Da Bakterien auf eine sehr effiziente Energienutzung angewiesen sind, wird die Expression der meisten Gene bereits auf der Ebene der Transkription umfangreich reguliert. Hierfür spielen vor allem die Promotoren – DNA-Sequenzen, welche die Wechselwirkung der RNA-Polymerase mit Bereichen stromaufwärts von Strukturgenen stabilisieren – eine besondere Rolle (siehe 1.8.1).

Die Expression eines bestimmten Gens kann durch verschiedene Methoden quantifiziert werden, die jeweils mit Vor- und Nachteilen behaftet sind. Die Fusion von vermeintlichen Promotorsequenzen eines Gens mit einem Reportergen wie *luc* bietet den Vorteil einer schnellen photooptischen Detektion der produzierten Luciferasemenge in Abhängigkeit von unterschiedlichen Promotoraktivitäten. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ergibt sich aus der Möglichkeit eine Messung *in vivo* durchzuführen. Die Präparation und Analyse von instabiler RNA, die möglicherweise mit Verlusten verbunden ist, entfällt. Posttranskriptionale Kontrollmechanismen, wie die Stärke der RBS, werden mit diesem System ebenfalls berücksichtigt. Dennoch besitzen solche Reportergensysteme zahlreiche Nachteile: Die Herstellung der Reportergenfusionen und die Einbringung in die Bakterienzelle ist zeitaufwendig und pro Zelle kann meist nur ein Promotor untersucht werden. Die Stabilität der mRNA als auch die Regulation der Transkription können durch Sequenzen des Gens mitbeeinflusst werden (100) und daher bei transkriptionalen Fusionen, die nur aus Promotor und Reportergen bestehen, verfälscht sein. Ein weiterer wesentlicher Nachteil solcher Reportergensysteme besteht darin, dass die Transkription entweder auf einem Plasmid oder im Chromosom an einem nichtursprünglichen Genlocus stattfindet. Da die umgebenden Sequenzen und die Transkription benachbarter Gene einen Einfluss auf den lokalen Überspiralisierungsgrad ausüben (siehe 1.1), können Analysen der Genexpression, die nicht an ihrem natürlichen Genlocus im Chromosom stattfinden, zu artifiziellen Ergebnissen führen (59, 144, 245, 282). Plasmidcodierte Reportergensysteme sind hiervon besonders betroffen und besitzen den zusätzlichen Nachteil, dass Transkriptionsfaktoren bei einer hohen Kopienzahl möglicherweise nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Die Kopienzahl und die Stabilität des Plasmids können sich unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zudem verändern (30, 283). Andere Methoden, mit denen die Expression eines oder auch mehrerer Gene zeitgleich untersucht wird, basieren auf der Präparation von nichtdegradierter Gesamt-RNA. Die darin enthaltene Menge an spezifischer mRNA kann entweder direkt durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde (Dot-blot-Analyse) oder entsprechend nach dem Umschreiben in stabilere cDNA nachgewiesen werden (z. B. cDNA Arrays). Der wesentliche Vorteil beider Methoden besteht darin, dass die Expression mehrerer Gene gleichzeitig quantifiziert werden kann. Allerdings werden relativ große Mengen an RNA benötigt und Transkripte von schwach exprimierten Genen sind nur schwer zu detektieren (283). Schwierigkeiten können sich zudem aus der unterschiedlichen Effizienz bei der Hybridisierung der Sonden ergeben, so dass es zu artifiziellen Expressionsmustern kommen kann. Eine weitere Methode zur Quantifizierung von mRNAs bietet die quantifizierende real-time RT-PCR. Für diese Methode wird ebenfalls RNA präpariert

und in stabilere cDNA mittels reverser Transkriptase umgeschrieben. In einem zweiten Schritt wird die cDNA jedoch in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern amplifiziert. Der Reaktionscharakter einer PCR beinhaltet eine Phase, in der eine einheitliche exponentielle Amplifikation stattfindet. Diese Phase dient der Quantifizierung der entstandenen Amplikons über die Zunahme von Fluoreszenz, die durch interkalierende Farbstoffe (SYBR[®] Green) oder nach der Spaltung von FRET- (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) Sonden, sogenannte „molecular beacons“, ausgestrahlt wird. Solche FRET-Sonden beinhalten einen Fluoreszenzfarbstoff, der nach Anregung seine Energie nicht als Fluoreszenz abgeben kann, sondern auf einen benachbarten sogenannten „Quencher“ überträgt. Erst nach Spaltung der Sonde oder Vergrößerung des Abstandes zwischen Fluoreszenzfarbstoff und „Quencher“ wird Fluoreszenz emittiert. Auf diese Weise lassen sich auch geringe cDNA-Mengen quantitativ nachweisen. Ein Nachteil dieser Methode besteht in einem hohen Optimierungsbedarf für die RT- bzw. PCR-Reaktion (48). Schwankungen in der Effizienz der RT-Reaktion lassen sich zudem nur schwer ermitteln. Die hierfür häufig verwendeten Kontrollgene (sogenannte housekeeping genes), werden in Bakterien nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen gleichmäßig transkribiert und sind daher nicht für alle Untersuchungen geeignet. Die Effizienz der RT-Reaktion ist zudem häufig sequenzabhängig, so dass sich genspezifische Unterschiede ergeben können. Im Gegensatz zu cDNA-Arrays, die eine zeitgleiche Quantifizierung mehrerer Tausend cDNAs ermöglichen, können mittels real-time RT-PCR – bedingt durch die geringere Kapazität des PCR-Geräts – nur etwa 100 cDNAs zeitgleich quantifiziert werden.

1.8.1 Regulation der Transkription

Für eine effiziente Transkription muss die RNA-Polymerase zunächst an eine als Promotor bezeichnete DNA-Sequenz binden (s. o.). Dieser Schritt der Initiation der Transkription unterliegt in Bakterien der stärksten Kontrolle. Wie in 1.1 geschildert, erfolgt für eine Vielzahl von Genen eine effiziente Initiation der Transkription nur bei einem bestimmten DNA-Überspiralisierungsgrad. Einige DNA-Bindeproteine wie CRP, IHF (integration host factor), FIS (factor for inversion stimulation), HU (heat-unstable nucleoid protein) oder H-NS verursachen durch ihre Bindung eine Biegung der DNA-Helixachse und beeinflussen damit ebenfalls die DNA-Topologie und somit auch die Effizienz der Initiation (265). Weiteren Einfluss haben die Promotorsequenz sowie zusätzliche Transkriptionsfaktoren, welche die Initiation fördern oder beeinträchtigen können. Das RNA-Polymerase core enzyme besteht aus 4 Untereinheiten ($\alpha_2\beta\beta'$) und ist mit einem σ -Faktor assoziiert. Dieser σ -Faktor, der einer von zwei Familien (σ^{70} und σ^{54}) angehören kann, verändert die Sequenzspezifität der DNA-Bindung

17 bp zwischen der -10- und -35-Region auf und werden unter normalem negativen Überspiralisierungsgrad optimal und nach einer DNA-Relaxierung nur vermindert exprimiert (9, 61, 273).

1.9 Zielsetzung

Die molekulare Wirkungsweise von Chinolonen auf bakterielle Typ II-Topoisomerasen ist weitgehend aufgeklärt. Die zellulären Auswirkungen einer Hemmung von Topoisomerase IV, die in gramnegativen Bakterien als sekundäre Zielstruktur für Chinolone nach Gyrase fungiert, sind hingegen wenig untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch eine gezielte Hemmung von Topo IV, weitere Erkenntnisse über die Wirkungsweise verschiedener Inhibitoren zu erhalten. In diesem Zusammenhang sollten die zellulären Effekte untersucht werden, die verschiedene Fluorchinolone sowie Inhibitoren aus den Klassen der Epipodophyllotoxine, Flavone und Cumarine nach einer Hemmung der Typ-II-Topoisomerasen auslösen. Hierfür standen *E. coli*-Mutanten zur Verfügung, an denen eine gezielte Hemmung von Gyrase oder Topo IV erreicht werden konnte.

Die Wirksamkeit von Topoisomerase-Inhibitoren ist nicht nur von ihrer Affinität zu den beiden Zielstrukturen abhängig, sondern auch von der Konzentration der Zielstrukturen und deren Funktion in der Zelle. Die Untersuchung der Genexpression der Strukturgene *parC* und *parE* für die A- und B-Untereinheiten von Topo IV auf Ebene der Transkription mittels quantitativer real-time RT-PCR sowie die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte sollte weitere Erkenntnisse über die Funktion dieses Enzyms in *E. coli* und dessen Bedeutung für die Wirksamkeit von Inhibitoren liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Die folgende Tabelle listet alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Isolate auf. Zusätzlich angegeben sind die genetischen Marker sowie die Herkunft bzw. Referenz der Stämme.

Tabelle 2-1: *E. coli* -Stämme

Stamm	Genetischer Marker	Referenz / Herkunft
RFM443	K-12, <i>rpsL200</i> (Str ^R), <i>galK2</i> , <i>lac</i> Δ74 (<i>lac</i> ⁻)	Menzel 1989
RFM443-242.1	RFM443, <i>gyrA</i> ^{S83W}	Diese Arbeit
DE112	RFM443, <i>tolC::miniTn10</i> (Tet ^R , McConkey ⁻)	Van Dyk et al. 1994
JM109	K-12, <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>relA1</i> , <i>thiA</i> , F' (<i>traD36 proAB⁻ lacI^f lacZΔM15</i>)	Yanisch-Perron et al. 1985
4917	<i>gyrA</i> ^{S83W} , <i>parC</i> ^{G78D}	Heisig & Wiedemann, 1991
I-6-19 (WT)	Wildtyp	Heisig & Tschorny, 1994
M I	WT, <i>gyrA</i> ^{S83L}	Heisig & Tschorny, 1994
WT-3-1	WT, <i>gyrA</i> ^{S83L,D78G}	Bagel, 1998
WT-4	WT, <i>parC</i> ^{S80I}	Bagel et al., 1999
M III	WT, <i>gyrA</i> ^{S83L,D78G} , <i>parC</i> ^{S80I}	Heisig & Tschorny, 1994
M III-300	WT, <i>gyrA</i> ^{S83L,D78G} , <i>parC</i> ^{S80I}	Schulte, 2001

2.1.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Desoxyoligonukleotide, die als Amplifikationsprimer oder zur cDNA-Synthese dienen, sind in Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3 aufgelistet und wurden überwiegend von der SIGMA-ARK GmbH, Darmstadt synthetisiert.

Tabelle 2-2: Oligonukleotide für real-time PCRs

Bezeichnung	bp	Sequenz 5'→3'	Herkunft
agaY-345F	22	CCTGCGTCTGTTGCAGACAATA	Diese Arbeit
agaY-395R	20	TCCACGCTGCAATCTTGTGA	Diese Arbeit
recA-908F	21	AGCGCGATATCCAGTGAAAGC	Diese Arbeit
recA-959R	21	CCATGGATGTGGAAACCATCTC	Diese Arbeit
srmB-312F	20	TCTGGATATCGCCACCATCA	Diese Arbeit
srmB-501R	21	GAAGCCCATATCCAGCATAACG	Diese Arbeit
gyrA-1327F	24	GTGCGTGATGGTCTGTACTACCTG	Diese Arbeit
gyrA-1377R	20	CAGAATCGCCTGAGCTTGCT	Diese Arbeit
parC-1941F	19	TCAGGCAGGCCGTATGTTG	Diese Arbeit
parC-1991R	19	GACAGCTGCGGCAGATCAC	Diese Arbeit
parE-1569F	20	GCCACCGCTCTACCGTATTG	Diese Arbeit
parE-1621R	20	CCGTCAGCGCGTAATAAACC	Diese Arbeit
rrsA-796F	20	CCTGGTAGTCCACGCCGTAA	Diese Arbeit
rrsA-846R	20	CTCAAGGGCACAACCTCCAA	Diese Arbeit

Tabelle 2-3: Oligonukleotide für Sequenzierungen, Klonierung und zur Bestimmung von mRNA-Startpunkten

Bezeichnung	bp	Sequenz 5'→3'	Herkunft
parE-829R-6-FAM	22	[6-FAM]AAGCCCGGTGAGTACCTCAATG	Diese Arbeit
parE-PE9	24	TGACGATCAACTCGAATTGCTAAC	Diese Arbeit
parE-PE10	20	TGGTGAGCAATGGCAAATCC	Diese Arbeit
parE-PE11	22	TTATTTCAACCCGATCGTCGAT	Diese Arbeit
parE-PE12	17	GCGGCAACCACGCATTC	Diese Arbeit
parE-PE13	22	AAGCCCGGTGAGTACCTCAATG	Diese Arbeit
parC-1296R-6-FAM	22	[6-FAM]AGGCGTTTTCCGTAATTCATG	Diese Arbeit
parC-PC9	24	CTGGCGAATAAGTTGAGGAATCAG	Diese Arbeit
parC-PC10	21	TGCCTTTGTGCTTGATCAGTG	Diese Arbeit
parC-PC11	21	GGCGCTATTCACGCTGATCTC	Diese Arbeit
parC-PC12	21	CTTTGAAGGCTGGCGAATAAG	Diese Arbeit
parC-PC13	22	AGGCGTTTTCCGTAATTCATG	Diese Arbeit
gyrA-242-5	26	CTTTGAATCCGGGATCCAGTAGAGGG	Diese Arbeit
gyrA-242-3	26	CACGATGCGGATCCCGTCTTTGTCAG	Diese Arbeit
gyrA-GA1	22	CCTTCGCGCGCCATACTCTCGG	Schulte, 2001
gyrA-GA2	22	AACCGTTCACCAGCAGGTTAGG	Schulte, 2001
PARC3-1	21	AGCTCGGAATATTTGACAAC	Heisig, 1996
Oligo W	23	GGTCATTGTTGGCCGTGCGCTGC	Heisig, Bonn
parC-U	25	ACCGGGATTCCGGTGTAACGCATTGC	Heisig, 1996
parC-S	25	GTATGCGATGTCTGAACTGGGCCTG	Heisig, 1996

GGATCC: *Bam*HI-Schnittstelle; mit 6-FAM markierte Primer wurden von Applied Biosystems bezogen

2.1.3 DNA-Größenmarker

In Tabelle 2-4 sind die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Größenmarker aufgelistet.

Tabelle 2-4: DNA-Größenmarker

Größenmarker	Hersteller / Herkunft
25 bp Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp Leiter	Gibco/BRL, Eggenstein
1 kb Leiter	Gibco/BRL, Eggenstein
Smart Ladder	Eurogentec, Seraing, Belgien
GeneScan™ 500 TAMRA size standard	Applied Biosystems
90 bp 6-FAM ParC/PC12	Diese Arbeit
159 bp 6-FAM ParC/PC11	Diese Arbeit
122 bp 6-FAM ParE/PE11	Diese Arbeit
153 bp 6-FAM ParE/PE12	Diese Arbeit

2.1.4 Vektoren

Tabelle 2-5 gibt die in dieser Arbeit benutzten Vektoren unter Angabe ihrer Funktion, ihrer relevanten genetischen Marker und ihrer Herkunft wieder.

Tabelle 2-5: Vektoren

Vektor	Relevante Marker	Funktion	Referenz / Herkunft
pBR322	Amp ^r , Tet ^r	Klonierung	Bolivar et al., 1977
pBR322-242	Amp ^r , Tet ^r	Klonierung	Diese Arbeit
pMAK705	Clm ^r , rep ^{ts}	Klonierung	Hamilton et al., 1989
pMAK705-242	Clm ^r , rep ^{ts} , <i>gyrA</i> ^(S83W)	Mutagenese	Diese Arbeit

2.1.5 Chemotherapeutika

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemotherapeutika (Tabelle 2-6) wurden nach der Einwaage in geeigneten Lösungsmitteln gelöst und anschließend sterilfiltriert.

Tabelle 2-6: Chemotherapeutika

Chemotherapeutika	Bezugsquelle
Ampicillin	Bayer AG, Leverkusen
Tetracyclin	Hoechst AG, Frankfurt
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Ciprofloxacin	Bayer AG, Leverkusen
Norfloxacin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Novobiocin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Moxifloxacin	Bayer AG, Leverkusen
Polymyxin B Nonapeptid (PMBN)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Rutin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Etoposid (VePesid®)	Bristol-Myers Squibb, Regensburg

2.1.6 Nährmedien

Sämtliche Nährböden und Nährlösungen wurden unmittelbar nach der Einwaage gelöst und bei 121 °C und 2,1 bar für 20 min autoklaviert.

Tabelle 2-7: Nähragar und Nährbouillon

Medium	Bezugsquelle bzw. Herstellung (Einwaage/Liter)
China-Blau-Lactose-Agar	OXOID, Wesel
LB-Agar, pH 7,3	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 14g Agar
LB-Medium, pH 7,3	10 g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10 g NaCl
Standard No.I (N I)-Nähragar	Merck, Darmstadt
Standard No.I (N I)-Nährbouillon	Merck, Darmstadt
Mueller-Hinton-Bouillon	OXOID, Basingstoke, England
Mueller-Hinton-Bouillon (Kationen-adjustiert)	Difco Laboratories, Detroit, USA
Isosensitest-Bouillon	Oxoid, Basingstoke, England

2.1.7 Puffer und Lösungen

Die nachfolgende Tabelle 2-8 gibt die verwendeten Puffer und Lösungen an. Selbst hergestellte Puffer (z. B. PBS- und Tris-Puffer) wurden sterilisiert.

Tabelle 2-8: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
PBS-Puffer	0,58 M Na ₂ HPO ₄ ; 0,17 M NaH ₂ PO ₄ ; 0,68 M NaCl, pH 7,4
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA
TBE-Puffer	89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA
TE-Puffer, pH8,0	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH8,0
6 x Ladepuffer	20 % Ficoll; 0,12 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol FF
5 x RNA-Ladepuffer	20 % Ficoll; 0,12 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol FF; 3 % Formamid; 7 M Harnstoff; Ethidiumbromid (150 µg/ml)
<u>Plasmid Midi Kit, QIAGEN, Hilden</u>	
Puffer P1	100 µg/ml 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; 15 % Isopropanol
Puffer QF	1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15 % Isopropanol
<u>QIAquick-spin, PCR Purification/Gel Extraktion Kit, QIAGEN, Hilden</u>	
Puffer EB	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>RNAprotect™ Bacteria Reagent RNA-Stabilisierungs-Reagenz, QIAGEN</u>	
<u>RNeasy® Mini, RNA-Extraktions Kit, QIAGEN, Hilden</u>	
Puffer RLT	Lysis- und Bindungspuffer, enthält Guanidinisothiocyanat, 5 % β-ME
Puffer RW1	Waschpuffer, enthält Ethanol
Puffer RPE	Waschpuffer, enthält Ethanol
<u>Sequencer Kit: Applied Biosystems, Weiterstadt</u>	
ABI PRISM® BigDye™	AmpliTaQ® DNA Polymerase,
Terminator Cycle Sequencing	fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotide;
Ready Reaction Mix V1.1	Desoxynucleotide; MgCl ₂ Tris-HCl, pH 9,0
Template Supression Reagent (TSR)	Denaturierungs-Reagenz
HiDi Formamide	Denaturierungs-Reagenz
POP-6™	Performance Optimized Polymer zur Auffrennung der DNA-Fragmente
Sequenzierpuffer 310 GA	ohne Angabe

2.1.8 Enzyme

In Tabelle 2-9 sind die in der Arbeit verwendeten Enzyme aufgeführt.

Tabelle 2-9: Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
RNase-Free DNase	QIAGEN, Hilden
Reverse Transkriptasen	
Multiscibe	Applied Biosystems, Weiterstadt
Omniscript	QIAGEN, Hilden
Superscript II RNase H ⁻	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phosphatase, alkalische, Shrimp	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rapid DNA Ligation Kit mit T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim; NEB, Frankfurt Gibco/BRL, Eggenstein
RNase H	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase Sequencing Grade	Promega, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

2.1.9 Chemikalien

Chemikalien (Tabelle 2-10) wurden mit dem Reinheitsgrad „reinst“ oder „p.a.“ bezogen.

Tabelle 2-10: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose Neo (DNase frei)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose NuSieve 3:1	Biozym, H. Oldendorf
dNTPs	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KgaA, Darmstadt
EDTA (Titriplex III)	Merck KgaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt
Ficoll	Merck KgaA, Darmstadt
Glycerin (85 %)	ASID Bonz und Sohn GmbH, Böblingen
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KgaA, Darmstadt
Phe-Arg-β-Naphtylamid (MC-207,110)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RiboGreen [®] RNA-Quantitation Kit	Molecular Probes, Leiden, NL
RNase Away	Roth, Karlsruhe
RNaseZAP [™]	Invitrogen, Leek, NL
SDS	Roth, Karlsruhe
SUPERase•In [™] RNase Inhibitor	Ambion, Huntingdon, UK
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.10 Geräte und Material

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

Tabelle 2-11: Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA
Platten-Photometer Multiskan-Multisoft®	Labsystems Oy, Helsinki, Finnland
Brutschrank	Heraeus, Osterode
DNA-Synthesizer 391	Applied Biosystems, Pfungstadt
Electrophoresis Power Supply	LKB Pharmacia, Freiburg
Elektroporationsgerät Genepulser II	Biorad Laboratories München
Pulse Controller II	
Filterspitzen, variabel	Biozym Diagnostik GmbH, H. Oldendorf
Gelelektrophorese-Apparaturen Typ Comphor	Biozym Diagnostik GmbH, H. Oldendorf
Midi und Mini	
GeneAmp 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gilson Kolbenhubpipetten, variabel	Abimed, Düsseldorf
Inolab pH-Meter	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Lichtmikroskop	Zeiss AG, Jena
mit Hyper HAD CCD-IRIS/RGB Color Video Camera	SONY International GmbH, Stuttgart
Reinstwasseranlage Easy Pure LF	Barnstead
Rollinkubator	Schütt, Göttingen
Schüttelinkubator Serie25	New Brunswick Scientific Co., New Jersey, USA
Schüttelinkubator Certomat R +H	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Schüttelwasserbad Typ 1083	Gesellschaft für 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 #3048 und #3331	
Biofuge A	Heraeus, Osterode
Kühlzentrifuge J2-21, Rotoren JA-20 und JA-21	Beckmann, Düsseldorf

2.2 Methoden

2.2.1 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 24 h bei 37 °C inkubiert. Die koloniebildenden Einheiten (KBE) wurden ausgezählt und auf 1 ml Bakteriensuspension bezogen (KBE/ml).

2.2.2 Identifizierung der Bakterien

Die Identifizierung der Bakterienstämme erfolgte mittels des Identifizierungssystems der Firma MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim. Verwendet wurden Mikrotitrationsplatten des Typs MICRONAUT-E, die für die Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen, Oxidase-negativen Bakterien vorgesehen sind. Die Identifizierung basiert auf 21 unterschiedlichen biochemischen Reaktionen, deren Nachweis über Säure-Indikatoren oder chromogene Substrate erfolgt.

Einzelne Kolonien einer 18-24 Stunden alten Bakterienkultur auf Isosensitest-Agar wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, die optische Dichte wurde auf den McFarland-Standard 0,5 ($OD_{560} = 0,12$) eingestellt. Dies entspricht einer Keimzahl von ca. 10^8 KBE/ml. 100 µl der Suspension wurden in 100 ml Isosensitest-Bouillon verdünnt. Die Mikrotitrationsplatten wurden mit 100 µl dieser Bakteriensuspension pro Vertiefung beschickt. Einzelne Vertiefungen wurden mit Parafinöl überschichtet und die Platten anschließend bei 37 °C für 18-24 h bebrütet. Nach der Inkubation wurde einzelnen Reaktionen Indol- bzw. TDA-Reagenz zugefügt. Vor dem Ablesen der Mikrotitrationsplatten wurde zur Farbentwicklung der beiden Reaktionen bis zu 30 min gewartet. Die Platten wurden mit dem Multiskan-Multisoft® Photometer abgelesen und mit der zugehörigen MCN-Computersoftware (Demos Computer, Köln) ausgewertet.

2.2.3 Bestimmung der Generationszeit

Die Wachstumskurve einer Bakterienpopulation weist zunächst eine Anlaufphase auf (lag-Phase), die nach einiger Zeit in eine exponentielle Phase (log-Phase) übergeht und schließlich nach einer stationären Phase in einer Absterbephase endet. Die Generationszeit von Bakterien wird innerhalb der exponentiellen Phase nach folgenden Formeln ermittelt:

$$v = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2(t - t_0)} \Rightarrow v \times \lg 2 = \frac{\lg N - \lg N_0}{(t - t_0)}$$

$$\frac{\lg N - \lg N_0}{(t - t_0)} = m \Rightarrow v = \frac{m}{\lg 2}$$

- v = Teilungsrate
 N = Zellzahl zum Zeitpunkt t
 N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt t_0
 m = Steigung der Regressionsgeraden im Bereich der exponentiellen Wachstumsphase bei halblogarithmischer Skalierung der Grafik

Die Generationszeit g ist der reziproke Wert der Teilungsrate v .

Um die Generationszeit der einzelnen Isolate zu messen, wurde eine 1:1000 Verdünnung der entsprechenden ÜN-Kultur in 100 ml N I-Medium angesetzt. Diese wurde bei 37 °C und 250 UpM inkubiert. In Abständen von 15 min wurden Proben entnommen, geeignet verdünnt und je 50 µl der letzten vier Verdünnungsstufen auf N I-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 37 °C bebrütet, die Kolonien bei geeigneter Verdünnungsstufe ausgezählt und anschließend die KBE/ml bestimmt. Aus den Werten wurde eine Grafik angefertigt, eine lineare Regression durchgeführt und anhand der obigen Formeln die Generationszeit g errechnet.

2.2.4 Reduzierung der Wachstumsrate

Eine Reduzierung der Wachstumsrate wurde durch Absenken der Inkubationstemperatur auf 24,5 °C und eine zusätzliche Halbierung des Nährstoffgehalts des Mediums (1/2 x N I-Agar) erzielt. Trübungsmessungen bei 24,5 °C mit 1/2 x N I-Bouillon zeigten, dass die Generationszeit von WT-4- und WT-3-1-Kulturen auf etwa 100 min anstieg. Zellen, die eine derart geringe Wachstumsrate aufweisen, besitzen nur 1 bis 1,2 DNA-Kopien pro Zelle (189) und sind daher in ihrer Fähigkeit zur homologen Rekombination beeinträchtigt.

2.2.5 Untersuchung der Zellmorphologie

Veränderungen in der Zellmorphologie, die infolge einer Behandlung mit Topoisomerase-Inhibitoren auftraten, z. B. Filamentierung der Zellen, Ausbildung von Vakuolen oder Zelllysis, wurden unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Hierzu wurden 15 µl der zu untersuchenden Bakterienkultur auf ein Deckglas pipettiert, umgedreht auf ein Objektträger gelegt und unter dem Mikroskop im Hellfeld bei 1000facher Vergrößerung beobachtet. Zur fotografischen Dokumentation wurden Agarose-beschichtete Objektträger (23) verwendet, wodurch die *E. coli*-Zellen unter dem Deckglas in einer Ebene fixiert wurden.

2.2.6 Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien

2.2.6.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

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 (77) durchgeführt.

Es wurde eine lineare Verdünnungsreihe des Antibiotikums durch sukzessive 1:2 Verdünnung in Kationen-adjustierter MH-Bouillon (KAMHB) 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 KAMHB gegeben wurde. Das erforderliche Inokulum von 5×10^5 KBE/ml wurde hergestellt, indem von einer 18-24 h alten Bakterienkultur auf MH-Agar einzelne Kolonien in KAMHB 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.

Da die verwendeten Stämme teilweise nur geringe Empfindlichkeiten gegenüber einigen Inhibitoren aufwiesen, wurde zur Testung von Rutin die Permeabilität und damit die Empfindlichkeit der Zellen durch Zugabe einer subinhibitorischen Konzentration (75 µg/ml) Polymyxin B Nonapeptid (PMBN) zum Inokulum erhöht (332). Für die Testung von Etoposid wurde teilweise der Effluxpumpeninhibitor MC-207,110 (209) in subinhibitorischen Konzentrationen (40-320 µM) zugegeben.

2.2.6.2 Empfindlichkeitstestung mittels Gradienten-Platten

Um keine distinkte MHK-Stufe sondern eine genaue Konzentration eines Antibiotikums, die zu einer Wachstumshemmung führt, zu ermitteln, wurden Agarplatten mit einem kontinuierlichen Konzentrationsgradienten eines Antibiotikums nach Szybalski (321) hergestellt (Abb. 2-1). Hierfür wurde zunächst flüssiger MH-Agar (40 ml) in eine schräg stehende rechteckige Kammer gegossen (Schritt 1). Nach dem Erkalten der ersten Agarschicht wurde die Kammer in eine horizontale Lage gebracht und mit antibiotikahaltigem MH-Agar überschichtet (Schritt 2). Es kommt zu einer vertikalen Diffusion des Antibiotikums zwischen den Agarschichten, so dass sich ein linearer Konzentrationsgradient parallel zur Längsachse der Kammer ausbildet.

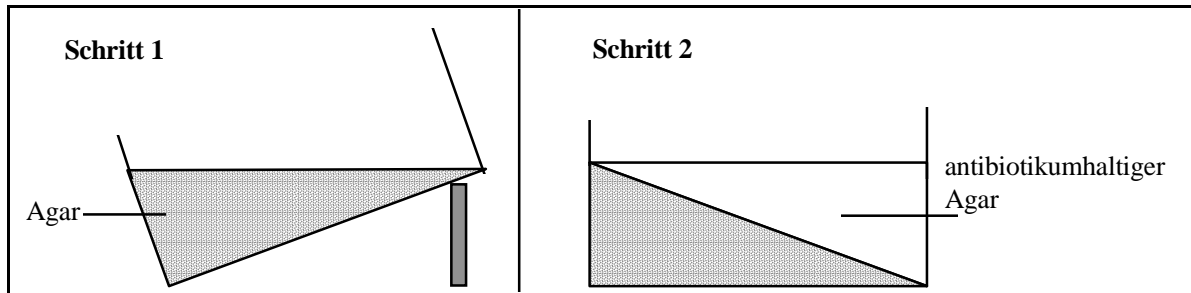


Abbildung. 2-1: Herstellung von Gradientenplatten nach Szybalski (1952)

Exponentiell wachsende Kulturen in MH-Bouillon wurden auf 10^6 KBE/ml verdünnt und mit einem Wattestäbchen in Richtung des Gradienten ausgestrichen. Nach einer Bebrütung für 24-48 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ wurde die MHK des Antibiotikums anhand der Wachstumsgrenze auf der Platte ermittelt.

2.2.6.3 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration

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 24 h die Keimzahl um mehr als 99,9 % reduziert (243).

Die Bestimmung der MBK erfolgte im Anschluss an die Bestimmung der MHK, indem aus vier Vertiefungen, entsprechend $1/2 \times$ MHK bis $4 \times$ MHK, nach Durchmischung jeweils $50\ \mu\text{l}$ entnommen wurden. Jedes Aliquot wurde auf einer einzelnen antibiotikumfreien MH-Agarplatte ausplattiert und somit das Problem eines Antibiotikum-Übertrags verhindert (19). Die Kolonien wurden nach Bebrütung (24 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$) ausgezählt.

2.2.6.4 Absterbekinetiken

Im Gegensatz zur Endpunktbestimmung, wie sie die MBK nach 24 h darstellt, ermöglichen Absterbekinetiken präzise Aussagen über den Zeitpunkt einer Wachstumshemmung oder den Zeitpunkt und das Ausmaß eines möglichen Verlusts der Teilungsfähigkeit bei einer bestimmten Inhibitorkonzentration. Es wurden jeweils Vielfache der MHK eines Antibiotikums eingesetzt, um Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen auszugleichen. Für alle Absterbekinetiken erfolgte die Inkubation in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 12-13 ml Nährbouillon (LB, NI oder KAMHB) oder Phospat-gepufferter Salzlösung (PBS) bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Luft- oder Wasserbad-Schüttler (130 UpM). Zu bestimmten Zeitwerten unmittelbar vor und nach Zugabe des Antibiotikums wurden Proben entnommen und eine Keimzahlbestimmung gemäß 2.2.1 durchgeführt. Ein Übertrag nennenswerter Antibiotikumkonzentrationen wurde

durch die Verdünnung vor dem Ausplattieren oder durch Filtrierung und Waschung mit 5 ml NaCl verhindert. Die graphische Darstellung erfolgte als Veränderung (Differenz) der logarithmierten KBE/ml (\log KBE/ml) über die Zeit.

Für Absterbekinetiken mit exponentiell wachsenden Kulturen wurden 15 ml Nährbouillon mit 1/1000 Vol einer in gleichem Nährmedium angezogenen ÜN-Kultur beimpft, bis zu einer $OD_{560} = 0,1$ (entsprechend etwa $2,0 \times 10^7$ KBE/ml) inkubiert, und dann das Antibiotikum zugesetzt. Da die verwendeten Stämme teilweise nur geringe Empfindlichkeiten gegenüber einigen Inhibitoren aufwiesen wurde zur Testung von Rutin die Permeabilität und damit die Empfindlichkeit der Zellen durch Zugabe einer subinhibitorischen Konzentration ($75 \mu\text{g/ml}$) Polymyxin B Nonapeptid (PMBN) erhöht (332). Die Zugabe von PMBN erfolgte zeitgleich mit dem Animpfen der Kultur. Zur Testung von Etoposid wurde zeitgleich mit diesem Topoisomerase-Inhibitor der Effluxpumpeninhibitor MC-207,110 in subinhibitorischer Konzentration ($40 \mu\text{M}$) zugegeben.

Für Absterbekinetiken mit wachstums- und teilungsinaktiven Zellen wurden exponentiell wachsende Kulturen nach dem Erreichen der $OD_{560} = 0,1$ und vor Zugabe des Antibiotikums entweder für 1 h mit Chloramphenicol ($50 \mu\text{g/ml}$) behandelt, oder abzentrifugiert, zweimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen und in PBS für 2 h resuspendiert.

2.2.7 Allgemeines Arbeiten mit RNA

Um Kontaminationen mit RNasen und in deren Folge eine Degradation von RNA zu vermeiden, wurden alle Arbeiten mit RNA mit puderfreien Einmalhandschuhen an einem separaten RNase-freien Platz mit einem separaten Pipettensatz und RNase-freien Filterspitzen durchgeführt.

2.2.8 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte aus 10^7 bis 10^9 Bakterien. Um eine Degradation von RNA durch zelluläre RNasen und Veränderungen der Genexpression während der Präparation zu vermeiden, wurde der zelluläre RNA-Pool zunächst stabilisiert. Hierzu wurde 1 Vol Zellsuspension (meist $490 \mu\text{l}$) direkt zu 2 Vol RNAprotect™ Bacteria Reagent (QIAGEN, Hilden) gegeben, für 5 s kräftig geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 8 min bei $7.000 \times g$ abzentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Der Zellaufschluss und die RNA-Isolierung erfolgte gemäß dem RNeasy Mini Protokoll (QIAGEN, Hilden). Hierzu wurde das Zellpellet mit 1 Vol TE-Puffer + Lysozym ($0,4 \text{ mg/ml}$) versetzt, für 4 min mit zwischenzeitlichem kräftigen Schütteln inkubiert. Anschließend wurden $3,5$ Vol RLT-Lysispuffer (mit 5 % β -Mercaptoethanol) zugefügt, kräftig geschüttelt und für

2 min inkubiert. RLT-Lysispuffer enthält das stark denaturierende Guanidin-Isothiocyanat, das RNasen sofort inaktiviert. Es wurden 2,5 Vol Ethanol zugefügt, das Reaktionsgefäß mehrfach vorsichtig invertiert und die Suspension auf die RNeasy-Säule pipettiert. Diese Säule enthält eine Silicagel-Membran, an die RNA adsorbiert. Nach der Zentrifugation (15 s bei $>8.000 \times g$) wurde das Zentrifugat entfernt, die Säule mit 350 μ l RW1 Waschpuffer für 5 min inkubiert und durch Zentrifugation gespült. In diesem Schritt wird ein Großteil der DNA eliminiert. Es folgte ein DNase-Verdau auf der Säule für 15 min bei Raumtemperatur mit dem RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Hilden). Im Anschluss wurde die Säule nochmals mit 350 μ l RW1 Puffer gespült und zusätzlich zweimal mit je 500 μ l RPE-Puffer gewaschen, wodurch auch die DNase entfernt wurde. Nachdem die Membran trocken zentrifugiert wurde, erfolgte die Elution der RNA in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß: Hierzu wurden zunächst 55 μ l RNase-freies Wasser (50 °C, QIAGEN, Hilden) auf die Säule appliziert, für 3 min inkubiert und abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mit weiteren 55 μ l RNase-freies Wasser (50 °C) wiederholt. Die RNA wurde dann auf Eis gelagert, die Konzentration bestimmt (2.2.9) und nach einer Aliquotierung bei -80 °C eingefroren.

2.2.9 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA nach dem DNase-Verdau, erfolgte indem die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) in einem Spektralphotometer bestimmt wurde. Die RNA-Proben wurden in einer 200 μ l Quarzglas-Küvette mit RNase-freiem Wasser soweit verdünnt, dass die Messwerte über 0,12 lagen. Die Konzentration errechnete sich aus der Formel:

$$c [\mu\text{g/ml}] = 40 \cdot A_{260} \cdot \text{Verdünnung}$$

2.2.10 Fluorometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Verifizierung der spektrometrischen Konzentrationsbestimmung erfolgte eine Konzentrationsbestimmung mit dem Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen[®] (Molecular Probes, NL). Mit einem RNA-Standard (16S rRNA) definierter Konzentration und dem RiboGreen[®] Assay Reagenz wurde zunächst mit verschiedenen Verdünnungen des Standards eine Eichgerade im Bereich von 20 ng/ml - 1 μ g/ml erstellt und anhand dieser Eichgerade die RNA-Konzentration der zu untersuchenden Probe ermittelt. Die Proben wurden zuvor 1:1000 und 1:500 verdünnt, um Werte im Konzentrationsbereich der Eichgerade zu erhalten.

2.2.11 Reinheitsbestimmung von RNA

Das Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit von RNA bezogen auf Verunreinigungen wie Proteine, die bei 280 nm absorbieren. Da dieses Absorptionsverhältnis durch den pH-Wert beeinflusst wird (353) und reines Wasser nicht gepuffert ist, wurde zur Verdünnung der RNA 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 verwendet. Reine DNA besitzt ein A_{260}/A_{280} Verhältnis von 1,9–2,1 in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.

Nur bei Werten $>1,9$ wurde die RNA für weitere Untersuchungen verwendet.

2.2.12 Qualitätsprüfung von RNA

Die Qualität der präparierten Gesamt-RNA wurde durch Gelelektrophorese in einem nativen TBE-Agarosegel anhand der rRNA-Banden überprüft. Unfragmentierte RNA zeichnet sich durch zwei distinkte rRNA-Banden im nativen Agarosegel aus, von denen die obere (23S rRNA) Bande etwa die doppelte Intensität der unteren (16S rRNA) Bande besitzt. Zur Linearisierung der rRNA wurde 1 µg Gesamt-RNA vor dem Auftrag auf das Gel in einem EtBr-haltigen denaturierenden 5 x RNA-Ladepuffer bei 75 °C für 10 min inkubiert (252) und auf Eis abgekühlt. Die Gelelektrophorese erfolgte für 1 h in einem 1 % nativen Agarosegel mit 1 x TBE Puffer und einer Feldstärke von 7 V/cm. Um Kontaminationen mit RNasen zu verhindern, wurde die Elektrophoresekammer sowie Gelrack und Applikationskamm zunächst mit 0,5 % SDS-Lösung gereinigt, mit RNase-freiem Wasser (aus der Millipor-Anlage) gespült, anschließend mit 1 % H_2O_2 für 10 min inkubiert und erneut mit RNase-freiem Wasser gespült.

2.2.13 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide

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

$$c \text{ [pmol/}\mu\text{l]} = \frac{A_{260} \cdot \text{Verdünnung}}{\text{Anzahl der Basen} \cdot 0,001}$$

2.2.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die von Kary Mullis entwickelte Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen wird als Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bezeichnet (285). 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:

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

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 des Standardansatzes in Tab. 2-12 durchgeführt. Für Ansätze mit einem Volumen von 20 μl wurde jeweils 1/5 der angegebenen Volumina eingesetzt.

Tabelle 2-12: PCR-Standardansatz für eine Reaktion à 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 (5 U/ μl)
ad 100 μl	Reinstwasser

Ein Zyklus der PCR besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Probe in Einzelstränge.
2. Anlagerung (Annealing) der Primer an die komplementäre Sequenz in der DNA-Probe.
3. Verlängerung (Extension) der ^{3'}OH-Enden der angelagerten Primer 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 15 min aufgeköcht. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (13.000 UpM, Raumtemperatur, 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:

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

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

Alle PCR-Reaktionen erfolgten nach folgenden Temperaturprofil:

Denaturierung:	94 °C	5 min	
Anlagerung:	T_A °C	30 s	25-35 x
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 durch eine Agarose-Gelelektrophorese statt (2.2.17).

2.2.15 Quantitative real-time RT-PCR

Die Quantifizierung von spezifischen mRNAs erfolgte durch eine Reverse Transkription (RT) mit nachgeschalteter quantitativer real-time PCR. Die verwendeten genspezifischen Primer (siehe Tabelle 2-2) wurden mit dem Programm Primer Express™ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) gemäß den Vorgaben für das Amplikon-Design für SYBR® Green-Applikationen (8) berechnet. Mittels BLAST-Suche wurden Primer mit unspezifischen Bindestellen im *E. coli* K12-Genom ausgeschlossen.

2.2.15.1 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese dient mRNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Strangs (cDNA) ausgehend von einem Starter-Oligonukleotid. Die Verlängerungsreaktion, auch als Reverse Transkription (RT) bezeichnet, wird am mRNA-Template durch retrovirale DNA-Polymerasen (Reverse Transkriptasen), katalysiert. Als Oligonukleotide wurden genspezifische Primer (GSP) verwendet, die nahe dem 3'-Ende des Gens binden. Die Kombination mehrerer GSP in einem Gemisch ermöglichte die gleichzeitige cDNA-Synthese mehrerer Gene. Für einen RT-Ansatz wurden folgende Komponenten auf Eis zusammenpipettiert:

Tabelle 2-13: RT-Ansatz für eine Reaktion à 20 µl

	Volumen	Komponente	Endkonzentration
Ansatz 1	x µl	RNA	150 ng
	2,4 µl	GSP-Mix (6 Primer à 2 pmol)	100 nM/Primer
	ad 6,5 µl	RNase-freies Wasser	
Ansatz 2	4 µl	5 x RT-Puffer	1 x
	2 µl	0,1 M DTT	10 mM
	4 µl	dNTPs (je 2,5 mM)	je 0,5 mM
		mischen	
	0,5 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,5 U/µl
	0,6 µl	Superscript II (200 U/µl)	6 U/µl bzw 120 U

Zunächst wurden der Ansatz 1 (Tab. 1-13) bei 65 °C für 5 min im Thermocycler denaturiert. Nach einem direkten Temperatur-Shift auf 45 °C wurde der für 2 min auf 45 °C vorgewärmte Ansatz 2 (Tab. 2-13) zugefügt, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und für 60 min bei 45 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde das Reaktionsgemisch für 15 min auf 70 °C erhitzt und sofort auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

2.2.15.2 real-time PCR

Die real-time PCR (Echtzeit-PCR) wurde von Higuchi und Mitarbeiter entwickelt (146, 147) und ermöglicht die Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels einer Fluoreszenzmessung. Im Gegensatz zu herkömmlichen PCR-Verfahren, bei denen eine Bestimmung von Endprodukten im besten Falle semiquantitativ stattfindet, erfolgt bei der real-time PCR eine Messung der DNA-Menge während oder nach jedem Zyklus und ermöglicht somit eine quantitative Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge.

Der zur DNA-Quantifizierung verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I interkaliert während der Primer-Verlängerungsreaktion in die neu gebildete dsDNA und fluoresziert nach Anregung durch eine Halogenlampe (296). Die emittierte Fluoreszenz wird durch eine CCD-Kamera detektiert und ist linear zur Konzentration der gebildeten dsDNA-Moleküle. Je mehr Startkopien in die PCR eingebracht werden, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Als Parameter für die Bestimmung der Startkopienzahl wird in der exponentiellen Phase der PCR der C_T-Wert (threshold cycle) berechnet, der in Bruchteilen die Zykluszahl angibt, bei dem die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert (in der vorliegenden Arbeit 0,1) überschreitet. Die Hintergrundfluoreszenz (Baseline), die in die Berechnung des C_T-Wertes eingeht, wurde zwischen Zyklus 3 und 6 Zyklen vor dem C_T-Wert festgelegt. Da SYBR[®] Green I unspezifisch in jede dsDNA interkaliert, verursachen auch Primer-Dimere, die sich während der PCR bilden, einen Fluoreszenzanstieg. Eine Überprüfung auf unspezifische Produkte (z. B. Primer-Dimere) erfolgte nach abgeschlossener PCR mittels

einer Analyse der Fragmente in einem 4 % NuSieve 3:1 Agarose-Gel (2.2.17) und einer Schmelzpunktanalyse im Thermocycler. Hierbei wurden die PCR-Produkte kontinuierlich von 60-95 °C aufgeheizt, so dass sie entsprechend ihrem Schmelzpunkt nur noch als Einzelstrang vorlagen. Die damit einhergehende Fluoreszenzabnahme wurde aufgezeichnet und ermöglichte die Differenzierung zwischen kurzen, bei niedriger Temperatur schmelzenden Primer-Dimeren und den längeren spezifischen PCR-Produkten.

Die Amplifikation und Detektion von cDNA erfolgte mit dem GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt) und der zugehörigen Software.

Für jede real-time PCR erfolgte eine Optimierung der Effizienz, indem zunächst der Einfluss der Primerkonzentrationen im Bereich 50-900 nM und anschließend der Magnesiumkonzentration im Bereich 3,0-4,25 µM getestet wurde. Die Effizienz der PCR wurde dann für jedes spezifische Template über einen Konzentrationsbereich von 3 Zehnerpotenzen ermittelt, indem das Verhältnis von C_T-Wert zum Logarithmus der relativen Startkopienzahl anhand einer Regressionsgeraden bestimmt wurde.

In dieser Arbeit wurde die real-time PCR gemäß des Standardansatzes in Tabelle 2-14 in dreifach-Ansätzen à 10 µl durchgeführt.

Tabelle 2-14: real-time PCR-Standardansatz für eine Reaktion à 10 µl

Volumen	Komponente	Endkonzentration
1 µl	cDNA-Template (RT-Ansatz 1/10 verdünnt)	1 Vol%; äquivalent zu 0,75 ng RNA
variabel	Primer F (5 pmol/µl)	150-300 nM
variabel	Primer R (5 pmol/µl)	75-450 nM
5 µl	2×SYBR® Green PCR Mastermix	3 mM MgCl ₂ , 200 µM dNTPs, 0,25 U AmpliTaq Gold®
0,4 µl	MgCl ₂ (25 mM)	4 mM (3 mM durch Mastermix)
ad 10 µl	Reinstwasser	

Um die Abweichungen zwischen Mehrfach-PCR-Ansätzen zu minimieren und möglichst gleiche Amplifikationsbedingungen für alle PCRs innerhalb eines Laufs (maximal 96 Reaktionen) zu erhalten, wurden zunächst verschiedene Mastermixe hergestellt:

Mastermix 1: 2×SYBR® Green PCR Mastermix, Reinstwasser, MgCl₂ (25 mM)

Mastermix 2: (Primer-spezifisch): Mastermix 1, Primer F, Primer R, Reinstwasser

Mastermix 3: (Amplikon-spezifisch): Mastermix 2, Template

Alle real-time PCRs erfolgten mit folgendem Temperaturprofil:

Aktivierung der AmpliTaq Gold [®] -Polymerase:		
95 °C	10 min	
Anlagerung/Verlängerung:	60 °C	30 s
Denaturierung:	95 °C	15 s
40 x		
Schmelzpunktanalyse:		
60-95 °C		

Als Negativkontrollen wurden eine „No Template“ Kontrolle und eine „No-RT“ Kontrolle (0,75 ng Gesamt-RNA als Template) mitgeführt.

2.2.15.3 Berechnung der Genexpression

Die Berechnung der Expression eines Gens erfolgte nicht absolut, sondern als relative Änderung infolge veränderter Kulturbedingungen, indem die mittleren C_T -Werte von mRNA-Äquivalenten (cDNAs) aus zwei unterschiedlichen Kulturbedingungen (Probe und Referenz) in einem RT-PCR-Lauf miteinander verglichen wurden. Als Schwellenwert (threshold) wurde 0,1 festgelegt. Für die Normalisierung der ermittelten C_T -Werte diente eine konstante Menge der in die RT-Reaktion eingesetzten Gesamt-RNA (47) von 150 ng bzw. das entsprechende cDNA-Äquivalent von 1/200 Vol des Gesamt-RT-Ansatzes. Die Berechnung der relativen Genexpression (EX_{rel}) erfolgte unter Einbeziehung des aus drei Messungen ($n = 3$) gemittelten C_T -Wertes (\overline{CT}) der Referenz (R) und der Probe (P) unter Einbeziehung der genspezifischen Effizienz der PCR-Reaktion (E_G) gemäß folgender Formel:

$$(1) \quad EX_{rel} = E_G^{(\overline{CT}_R - \overline{CT}_P)}$$

Die empirische Standardabweichung des mittleren C_T -Werts ($s\overline{CT}$) mit $n = 3$ (Dreifachansatz siehe 2.2.15.2) wurde gemäß folgender Formel berechnet:

$$(2) \quad s\overline{CT} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (CT_i - \overline{CT})^2}{n-1}}$$

Die Standardabweichung der mittleren relativen Genexpression (sEX_{rel}) wurde unter Berücksichtigung des Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes (31) basierend auf der folgenden von Muller et al. beschriebenen Formel (237) berechnet:

$$(3) \quad sEX_{rel} = E_G^{(\overline{CT}_R - \overline{CT}_P)} \cdot \sqrt{(\ln(E_G) \cdot s\overline{CT}_R)^2 + (\ln(E_G) \cdot s\overline{CT}_P)^2}$$

Da die Effizienzbestimmung ebenfalls fehlerbehaftet ist und dies in Formel (3) nicht berücksichtigt ist, wurde zunächst der Standardfehler der Effizienz (sE) mit folgender Formel ermittelt, wobei $\Delta\text{Steigung}$ den Standardfehler der Regressionsgeraden darstellt:

$$(4) \quad sE = 10^{\frac{-1}{\text{Steigung}}} \cdot \ln(10) \cdot \frac{\Delta\text{Steigung}}{\text{Steigung}^2}$$

Der Gesamtfehler der mittleren relativen Genexpression (sEx_{rel}) wurde unter Berücksichtigung des Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes gemäß folgender Formel berechnet:

$$(5) \quad sEx_{rel} = E_G^{(\overline{CT}_R - \overline{CT}_P)} \cdot \sqrt{\left(\left(\overline{CT}_R - \overline{CT}_P\right) \cdot \frac{sE_G}{E_G}\right)^2 + \left(\ln(E_G) \cdot s\overline{CT}_R\right)^2 + \left(\ln(E_G) \cdot s\overline{CT}_P\right)^2}$$

Die Standardabweichung der mittleren relativen Genexpression aus Wiederholungsexperimenten mit unterschiedlichen RNA-Proben (ΔEx_{rel}) wurde unter Berücksichtigung des Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetzes nach folgender Formel berechnet:

$$(6) \quad \Delta Ex_{rel} = \frac{1}{n} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (s_i Ex_{rel})^2}$$

Zur Ermittlung von statistisch signifikanten Unterschieden in der Genexpression wurde ein Test auf Gleichheit durchgeführt ($H_0: \mu_x = \mu_y$). Die Nullhypothese (H_0) der Gleichheit wurde akzeptiert falls:

$$\frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{\frac{\Delta Ex_{rel}(x)}{n} + \frac{\Delta Ex_{rel}(y)}{m}}} < Z_{\alpha/2}$$

andernfalls bestand ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) von $< \alpha/2$. Der $z_{\alpha/2}$ -Wert wurde aus der Gauß'schen Normalverteilung entnommen, da nicht die empirischen Varianzen, sondern die mittels Fehlerfortpflanzung bestimmten Standardfehler (ΔEx_{rel}) verwendet wurden.

Die Bestimmung der empirischen Varianz und die Verwendung der von W.S. Gosset beschriebenen t-Statistik (121) erwies sich auf Grund der sehr geringen Stichprobenzahl (z. B. $n = 3$) als ungeeignet zur Bestimmung von statistisch signifikanten Unterschieden der Genexpression.

2.2.16 Bestimmung von 5' mRNA-Enden

Eine Methode für die Bestimmung von 5' mRNA-Enden, d. h. der Transkriptionsstartpunkte von Genen, stellt die „Primer-Extension“-Analyse dar. Hierbei bindet ein meist radioaktiv-markierter DNA-Primer etwa 100 pb stromabwärts des vermuteten Transkriptionsstartpunkts an die mRNA und wird mittels einer Reversen Transkriptase bis zum 5' mRNA-Ende verlängert. Wird mit diesem Primer zusätzlich eine radioaktive Sequenzierung durchgeführt, ermöglicht die parallele Auftragung der Sequenzierungsfragmente mit der cDNA auf einem Polyacrylamidgel nach der Detektion die Bestimmung der Länge als auch die relative Häufigkeit der cDNAs und somit der vermeintlichen Transkriptionsstartpunkte. Sekundärstrukturen in der mRNA können die Reverse Transkriptase zu einem vorzeitigen Abbruch der cDNA-Synthese zwingen, wodurch die cDNA das 5' mRNA-Enden nicht korrekt widerspiegelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Verfahren entwickelt, das auf der „Primer-Extension“-Analyse basiert, jedoch Primer verwendet, die an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-fluorescein Phosphoamidite (6-FAM) markiert waren. Die Detektion und Längenbestimmung der Fluoreszenz-markierten cDNAs erfolgte im POP-6™ Polymer (Applied Biosystems) durch Kapillarelektrophorese im ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) mit Hilfe verschiedener Längenstandards und der GeneScan® Software (Version 3.1.2, PE Applied Biosystems). Für einen „Primer-Extension“-Ansatz wurden folgende Komponenten auf Eis zusammenpipettiert:

Tabelle 2-15: „Primer-Extension“-Ansatz für eine Reaktion à 50 µl

	Volumen	Komponente	Endkonzentration
Ansatz 1	x µl	Gesamt-RNA	35 µg
	1 µl	6-FAM-Primer (0,5 mol/µl)	10 nM
	ad 32 µl	RNase-freies Wasser	
Ansatz 2	5 µl	10 x RT-Puffer	1 x
	5 µl	dNTPs (je 2,5 mM)	je 0,5 mM
		mischen	
	2 µl	RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,8 U/µl
	6 µl	Omniscrypt RT (4 U/µl)	0,5 U/µl bzw 24 U

Zunächst wurde der Ansatz 1 (Tabelle 2-15) bei 65 °C für 5 min im Thermocycler denaturiert. Die Anlagerung des 6-FAM-ParC- oder 6-FAM-ParE-Primers erfolgte schrittweise (60 °C für 1 min, 56 °C für 10 min, 50 °C für 1 min und 45 °C für 1 min). Der für 2 min auf 43 °C vorgewärmte Ansatz 2 (Tabelle 2-15) wurde zugefügt, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und für 60 min bei 43 °C inkubiert. Im Anschluss folgten 5 Zyklen (50 °C für 1 min, 53 °C für 1 min und 56 °C für 1 min) Durch dieses Temperaturprofil sollten mögliche Sekundärstrukturen destabilisiert werden bei gleichzeitig geringer Inaktivierung der Reversen Transkriptase (325).

Im Anschluss wurde die RNA durch eine alkalische hydrolytische Spaltung entfernt (325). Hierzu wurden 1 µl 0,5 M EDTA gefolgt von 12,5 µl 0,2 M NaOH zugesetzt und für 5 min bei 68 °C inkubiert. Nach einer Neutralisierung durch Zugabe von 12,5 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,4) wurde die cDNA durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Vol Ethanol bei – 20 °C für 1 h gefällt. Die cDNA wurde bei 4 °C und 20.000 x g für 20 min abzentrifugiert, zweimal mit 0,5 ml 80 % Ethanol gewaschen und der Überstand nach der Zentrifugation (10 °C, 20.000 x g für 10 min) vorsichtig mittels Vakuum abgesaugt. Das bei Raumtemperatur getrocknete Pellet wurde in 20 µl 1 mM Tris-Puffer, pH 8,5 aufgenommen. Zur Entfernung überschüssiger 6-FAM-Primer wurde die cDNA mittels QIAquick-Säulen gemäß (2.2.18.2) gereinigt und erneut wie oben beschrieben gefällt. Die gereinigte und pelletierte cDNA wurde in 6 µl 1 mM Tris-Puffer, pH 8,5 aufgenommen. Für die Bestimmung der Fragmentlängen der cDNA wurden 2 µl, äquivalent zu 11 µg RNA in den folgenden Ansatz eingesetzt.

Tabelle 2-16: Ansatz für die Fragmentlängenbestimmung

Volumen	Komponente
10 µl	HiDi Formamide
0,5 µl	GeneScan™ 500 TAMRA size standard
3 µl	6-FAM-markierte cDNA

Vor dem Auftragen auf die Kapillare wurde dieser Ansatz bei 90 °C für 2 min denaturiert. Die Auswertung der Fragmentlängen erfolgte anhand des TAMRA 500er Längenstandards (Fragmente von 75, 100, 139, 150, 160 200, 248, 300, 339 und 350 bp, die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxy-tetramethyl-rhodamin (TAMRA) markiert sind) und der GeneScan® Software (PE Applied Biosystems). Da die Laufeigenschaften von denaturierter DNA im POP6-Polymer auch sequenzabhängig sind, wurden zur Validierung der ermittelten Fragmentlängen definierte 6-FAM-Größenstandards der stromaufwärts von *parC* und *parE* liegenden Sequenzen verwendet. Diese in Tabelle 2-4 aufgelisteten 6-FAM-Größenstandards wurden mittels PCR hergestellt.

2.2.17 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, wodurch die Wanderung von größeren Fragmenten stärker behindert wird als von kleineren Molekülen. 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. Für hochprozentige Gele wurde NuSieve 3:1 Agarose verwendet. Dazu wurde die Agarose in 0,5 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wurde Ethidiumbromid (10 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in DNA-Doppelstränge, wodurch diese unter UV-Licht sichtbar werden. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde es mit 0,5 x TAE-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 separat auf das Gel aufgetragen wurde.

2.2.18 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

2.2.18.1 Extraktion von DNA-Banden aus Agarosegelen

Für die Reisolierung kleinerer DNA-Fragmente (bis 1.000 bp) 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 Silicagel-Membranen, wenn hohe Konzentrationen eines chaotropen Salzes vorliegen. Die Silicagel-Membran der QIAquick Spin-SäuleTM 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 QX-1 Lösung pipettiert. Der Ansatz wurde 10 min im Wasserbad (50 °C) bis zur Auflösung der Agarose inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 Vol Isopropanol versetzt und stark geschüttelt.

Die Suspension wurde auf eine QIAquick-Säule pipettiert und nach einer einminütigen Einwirkzeit bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl QX-1 Lösung behandelt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Durch zweimaliges Zentrifugieren wurde restlicher Puffer von der Säule entfernt und diese an der Luft für 5 min getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl 1 mM Tris-Puffer, pH 8,5 nach einer 5minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Elution wurde durch erneuten Auftrag des ersten Eluats wiederholt, wodurch sich die Ausbeute um 15 % erhöhte.

2.2.18.2 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 Zentrifugation (1 min, 13.000 UpM) wurde die Durchflussfraktion verworfen. Das Waschen der Säule und die Elution der DNA erfolgte wie unter 2.2.18.1 beschrieben.

2.2.18.3 Reinigung und Konzentrierung von DNA durch Ethanolfällung

Die DNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M NaAc (pH 5,4) und 2 Vol Ethanol (100 %) für 20 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Die gefällte DNA wurde durch eine erste 30minütige Zentrifugation bei $20.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Das Ethanol wurde vorsichtig mittels Vakuum 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 Vakuum abgesaugt, das DNA-Pellet bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und in dem gewünschten Volumen TE-Puffer oder 1 mM Tris-HCl (pH 8,5) resuspendiert.

2.2.19 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.19.1 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 2-17

Tabelle 2-17: Restriktionsansatz

Volumen	Komponente
x μl	DNA (0,25-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
y μl	Restriktionsenzym (10 U/ μl)
1/10	10 x Restriktionspuffer
z μl	aqua dest

Die Enzymmenge (Units), 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:

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

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

2.2.19.2 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 alkalischer Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Der Dephosphorylierungsansatz wurde gemäß Tabelle 2-18 angesetzt.

Tabelle 2-18: Dephosphorylierungsansatz

Volumen	Komponente
x µl	Vektor DNA (15 ng)
0,3 µl	Dephosphorylierungs-Puffer (10 x)
1 µl	SAP
ad 2,9 µl	aqua dest

Der Dephosphorylierungsansatz wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 20 min bei 65 °C deaktiviert. Der nachfolgende Ligationsansatz wurde gemäß Tabelle 2-19 angesetzt. Dabei wurde vor Zugabe des Ligationspuffers und der Ligase jeweils kräftig gemischt.

Tabelle 2-19: Ligationsansatz

Volumen	Komponente
2,9 µl	Vektor DNA (Dephosphorylierungsansatz)
y µl	Insert-DNA (82-100 ng)
1,9 µl	DNA-Dilution buffer (5 x)
ad 9,5 µl	aqua dest
10 µl	Ligation buffer (2 x)
1 µl	T4 Ligase

Aufgrund des Größenverhältnisses zwischen Vektor (pBR322, pMAK507) und Insert (928 bp) von 4,6-6,1:1 wurde ein molares Verhältnis für Vektor zu Fragment von 1:1 gewählt, wobei die Gesamtmenge an DNA im Ansatz 100 ng betrug. Der Ligationsansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die anschließende Transformation in CaCl₂-kompetente Zellen wurden 50 ng des Ligationsansatzes zu 100 µl Zellen gegeben. Für eine Transformation in elektro-kompetente Zellen wurde der Ligationsansatz zunächst entsalzt (2.2.20) und dann 1/10 Vol (10 ng) zu 50 µl Zellen gegeben.

2.2.20 Entsalzung des Ligationsansatzes

Soll ligierte DNA mittels Elektroporation (2.2.22.4) in die Zellen eingeschleust werden, so muss gewährleistet sein, dass der Ligationsansatz minimale Salz-Konzentrationen enthält, da es ansonsten zu einem Spannungsbogen in der Elektroporationsküvette kommt und diese zerstört wird. Die Entsalzung des Ligationsansatzes erfolgte mittels QIAquick Säulen, gemäß der Aufreinigung von DNA-Fragmenten (2.2.18.2).

2.2.21 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 mit dem pMB1 Replikations-System wie pBR322 wurde die Kopienzahl erhöht, indem nach dem Erreichen einer $OD_{560} = 0,5$ Chloramphenicol ($20 \mu\text{g/ml}$) zur Kultur zugegeben wurde (103).

2.2.21.1 Plasmid-Minipräparation mittels Silicagel-Säulen

3-5 ml ÜN-Kultur werden 10 min bei $4.000 \times g$ in Falcon-Röhrchen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in $250 \mu\text{l}$ Puffer P1 + RNase (20mg/ml) resuspendiert, wodurch ein Aufbruch der Zellen erzielt wird. Es wurden $250 \mu\text{l}$ alkalischer Puffer P2 zugesetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig durch Invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von $350 \mu\text{l}$ eisgekühlten Neutralisationspuffer P3 wurde die genomische DNA ausgefällt und bei der anschließenden Zentrifugation (10 min, 13.000UpM) sedimentiert.

Die Extraktion der Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte mittels einer QIAquick Spin-SäuleTM (QIAGEN, Hilden) wie bereits unter 2.2.18.1 beschrieben mit folgender Modifikation: Der Plasmid-haltige Überstand wurde auf die Säule pipettiert und für 60 s bei 13.000Upm abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und $500 \mu\text{l}$ PB-Puffer auf die Säule appliziert. Das Waschen der Säule und die Elution der Plasmid-DNA erfolgte wieder gemäß 2.2.18.1.

2.2.21.2 Plasmid-Minipräparation modifiziert nach BIRNBOIM und DOLLY

Zur Überprüfung von Plasmid-DNA nach einer Transformation wurde eine nach Birnboim & Dolly (32) 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 10 min Zentrifugation bei 13.000 UpM entmischt und die wässrige obere Phase weiter verwendet.

Zur Fällung der DNA wurde der Ansatz mit 1 Vol eiskaltem absolutem Ethanol versetzt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 20.000 x g wurde der Überstand abdekantiert und das DNA-Pellet mit 2 Vol 70%igem 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.

2.2.21.3 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 4.000 x g und 4 °C für 10 min. Das Zellpellet wurde in 4 ml P1-Puffer resuspendiert, der mit RNase (100 µg/ml) versetzt war. Nach Zugabe von 4 ml des alkalischen P2-Puffers wurden die Zellen für maximal 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Zur Neutralisation wurden 4 ml eiskalter P3-Puffer zugegeben, der Ansatz sorgfältig gemischt und 15 min 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%igem 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-HCl (pH 8,5) resuspendiert.

2.2.22 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

2.2.22.1 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 (65) wurde eine Übernachtskultur 1:200 in 25 ml N I-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 5 min bei 4.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,5 Vol (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.

2.2.22.2 Transformation nach der Methode von HANAHAN

Zellen, die mit CaCl₂ kompetent gemacht wurden (2.2.22.1), werden nach 24 h Lagerung im Kühlschrank für die Transformation eingesetzt. Die Transformation wurde in eisgekühlten 15 ml Falcon-Röhrchen durchgeführt.

Für die Transformation nach Hanahan (129) wurden 100 µl kompetente Zellen mit 50 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt. Um die Transformationseffizienz zu steigern wurden dem Ansatz 1,7 µl β-Mercaptoethanol (1,42 M) zugegeben, so dass es in einer Endkonzentration von 25 mM vorlag. Es folgte eine 30minütige Inkubation auf Eis, während der sich DNA an die Cytoplasmamembran anlagert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s 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 1-2 min auf Eis abgekühlt und 1 h in 900 µl vorgewärmten LB-Medium bei 37 °C im Rollinkubator inkubiert. In dieser Regenerationsphase kommt es zur phänotypischen Ausprägung der Plasmid-vermittelten Antibiotika-Resistenzen. Anschließend wurden 100 µl Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden nicht-transformierte kompetente Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert.

2.2.22.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Eine ÜN-Kultur wurde 1:250 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₅₄₆ 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 x 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 Vol (250 ml) eiskaltem sterilen H₂O versetzt und 12 min bei 4.000 x g und 4 °C abzentrifugiert (1. Waschung). Nach Abdekantieren des Überstandes und vorsichtiger Resuspension im Restüberstand wurden 0,5 Vol eiskaltes 10 % Glycerin zugegeben und 12 min bei 4.000 x 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 x 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 kaltem Methanol schockgefroren und die elektrokompetenten Zellen bei -70 °C gelagert. Die Zelldichten betragen zwischen 2,5 x 10⁹ und 3,5 x 10¹⁰ Zellen/ml.

2.2.22.4 Elektroporation

DNA-Transformation durch Elektroporation nach Dower et al. (81) stellt eine weitere sehr effiziente Methode zur Einschleusung von fremder DNA in die Zelle dar. Dazu wird ein Ansatz mit entsalzter DNA und elektrokompetenten Zellen kurzzeitig einer hohen elektrischen Spannung von 2 kV ausgesetzt. Elektrische Felder induzieren in der Membran eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle, so dass während des elektrischen Impulses DNA ins Zellinnere diffundieren kann.

50 µl elektrokompetente Zellen (2.2.22.3) wurden auf Eis aufgetaut, 10 ng entsalzte 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 zirkulärer Vektor in die Zellen eingeschleust.

2.2.23 In-vitro-Mutagenese

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur in-vitro-Mutagenese basiert auf einem DNA-Austausch durch homologe Rekombination mit dem von Hamilton et al. beschriebenen rekombinanten Plasmid pMAK705 (128) und wurde, wie von Hüllen beschrieben (164), modifiziert. Das rekombinante Plasmid pMAK705 ist unter hohen Temperaturen (42 °C) nicht in der Lage sich zu replizieren und kann daher unter solchen Temperaturen nur nach einer Integration ins Chromosom existieren. Diese Integration wird durch homologe Rekombination zwischen chromosomalen Genabschnitten und klonierten homologen DNA-Sequenzen auf dem Plasmid ermöglicht. Als Selektionsmarker besitzt das Plasmid ein Gen, das Chloramphenicol-Resistenz vermittelt.

Die Stämme RFM443 und DE112 wurden mit dem rekombinanten Plasmid pMAK705-242 (2.2.23.1) via Elektroporation (2.2.22.4) transformiert und auf LB-Agar mit 25 µg/ml Clm selektiert. Zehn Kolonien wurden in 100 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Clm suspendiert und für 4 h bei 43 °C und 225 UpM inkubiert. Unter diesen Bedingungen vermehren sich nur solche Zellen, die das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert haben, jedoch mit geringerer Wachstumsrate. Anschließend wurde eine 1:1000 Verdünnung für 6 h bei 43 °C inkubiert und dieser Schritt zweimal wiederholt. Nachfolgend wurde eine Bestimmung der Zellzahl und der Anzahl der Kointegrate durchgeführt, indem geeignete Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit Clm bei 30 °C und 43 °C ÜN inkubiert wurden.

Aus der letzten Flüssigkultur wurde wiederum eine 1:1000 Verdünnung in LB-Medium mit 25 µg/ml Clm hergestellt und bei 30 °C für 4 h inkubiert. Diese Temperatursenkung ermöglicht das Auskreuzen des Plasmids und durch die höhere Wachstumsrate dieser Zellen eine entsprechende Selektion. Durch drei weiteren Passagen bei 30 °C für 4 h wurden solche Zellen angereichert. Geeignete Verdünnungen wurden auf LB-Agar mit 30 µg/ml Clm ausplattiert, bei 30 °C ÜN inkubiert und anschließend 1/10 einer Kolonie mit einem Zahnstocher in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 100 µl LB-Medium gegeben. Mit Hilfe eines Replikastempels, an dem 1 µl haftet, wurde nun 2 x sukzessive 1:100 in LB-Medium verdünnt. Aus der letzten 1:10000 Verdünnung wurden mit dem Replikastempel zwei LB Agarplatten (25 µg/ml Clm) beimpft und bei 30 °C bzw. 43 °C inkubiert. Parallel wurden zwei Antibiotikum-freie LB-Agarplatten beimpft und analog inkubiert. Aufgrund der höheren Sensitivität von DE112 erfolgten alle Selektionen nur mit 6 µg/ml Clm.

Isolierung von Mutanten

Zur Eliminierung des Plasmids wurde die Mikrotiterplatte für 4 h ohne Selektionsdruck bei 43 °C inkubiert und dieser Vorgang nach einer 1:100 Verdünnung zweimal wiederholt. Auf diese Weise wurden Plasmid-freie Zellen angereichert, da erneute Kointegrate langsamer wachsen. Anschließend wurden nach geeigneter Verdünnung mit dem Replikastempel LB-

Agarplatten mit steigenden Konzentrationen von Cip (0,0125-1 µg/ml), sowie mit Clm 25 µg/ml bzw. 6 µg/ml beimpft. Als positive Klone wurden Kolonien gewertet, die nicht auf Clm-Platten jedoch unter Ciprofloxacin-Konzentrationen wuchsen, die dem 4-8fachen der MHK des Wildtyps entsprachen. Entsprechende Mutanten wurden anschließend sequenziert.

2.2.23.1 Herstellung des rekombinanten Plasmids pMAK705-242

Mittels High-fidelity-Polymerase (Roche, Mannheim) und den Primern GyrA-242-5 und GyrA-242-3 wurde aus *E. coli* 4917 ein Fragment amplifiziert, das die *gyrA*^{S83W}-Mutation trägt und von *Bam*HI-Restriktionsseiten flankiert ist. Nach einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI (2.2.19.1) wurde das Fragment zunächst mit pBR322 ligiert (pBR322-242) und in *E. coli* JM109 transformiert, um das Fragment zu sichern. Das *gyrA* *Bam*HI-Fragment wurde aus pBR322-242 isoliert (Restriktionsverdau mit *Bam*HI und Extraktion aus Agarosegel) und in die *Bam*HI-Seite innerhalb der Polylinker-Region von pMAK705 subkloniert. Die Selektion positiver Klone erfolgte durch „blue-white“-Screening (215). Hierdurch entstand das rekombinante Plasmid pMAK705-242 (Abb. 2-2), das in *E. coli* JM109 und die Stämme RFM443 und DE112 transformiert wurde. Die *gyrA*^{S83W}-Mutation im PCR-Fragment und in pMAK705-242 wurde durch eine Sequenzierung verifiziert.

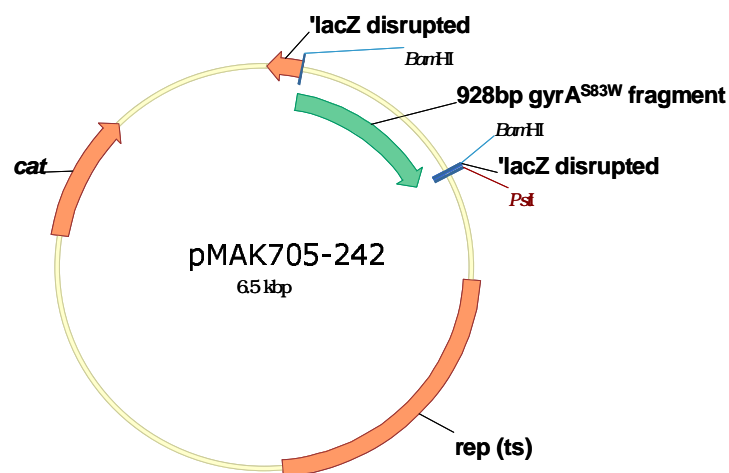


Abb. 2-2: Plasmidkarte von pMAK705-242; cat, Chloramphenicol-Acetyltransferase; rep (ts), Temperatur-sensitives Replikon

2.2.24 Sequenzierung von DNA

Die Methode zur DNA-Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (288). 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'-

Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs). Aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am C-3-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-Sequenziergerät 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 2-20: Reaktionsansatz für das Cycle Sequencing

Volumen	Komponente
4 µl	Ready Reaction Mix V1.1
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 2-21: Temperaturprofil

Denaturierung:	96 °C	2 min	
Denaturierung:	96 °C	10 s	25 x
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 NaAcetat, pH 4,8 und 250 µl 100 % Ethanol gegeben. Darauf folgte eine erste 30minütige 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 Vakuum 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 für 2 min denaturiert.

3 Ergebnisse

3.1 Zelluläre Effekte nach Hemmung von Topoisomerase IV oder Gyrase

Für verschiedene Topoisomeraseinhibitoren sollten die Auswirkungen auf die Zellmorphologie, das Zellwachstum und die Lebensfähigkeit in Abhängigkeit von der gehemmten Zielstruktur (Topoisomerase IV oder Gyrase) und von der Zellphysiologie (Wachstums- und Zellteilungsaktivität) untersucht werden.

Topoisomerase IV (Topo IV) ist in *E. coli* die sekundäre, Gyrase die primäre Zielstruktur für die klinisch bedeutsamen Antibiotika aus der Klasse der Chinolone. Die zellulären Auswirkungen einer Hemmung von Topo IV durch Chinolone lassen sich daher nur untersuchen, wenn Gyrase durch entsprechende Mutationen unempfindlich gegenüber diesen Hemmstoffen wird. Für die vorliegende Arbeit wurden daher entsprechende *E. coli*-Stämme ausgewählt bzw. konstruiert, in denen durch eine Einzelmutation in *gyrA*, z. B. *gyrA*^{S83L} (M I), oder *gyrA*^{S83W} (RFM443-242.1) bzw. durch eine Doppelmutation *gyrA*^{S83L, D87G} (WT-3-1) nunmehr Topo IV die bevorzugte Zielstruktur für Chinolone darstellt. Stamm WT-3-1 bot gegenüber M I oder RFM443-242.1 den Vorteil, dass aufgrund seiner gegenüber Chinolonen unempfindlicheren Gyrase diese Zielstruktur auch bei höheren Konzentrationen nicht gehemmt wird. Im Vergleich hierzu sollten die zellulären Effekte nach einer Hemmung von Gyrase mittels des Stamms WT-4 erfasst werden, der aufgrund einer *parC*^{S80I}-Mutation eine gegenüber Chinolonen unempfindliche Topo IV besitzt. Mit diesen Stämmen sollte zudem die Wirkungsweise anderer Inhibitoren, wie Etoposid oder Rutin, sowie ihre mögliche Präferenz für Topo IV oder Gyrase untersucht werden.

3.1.1 Charakterisierung der verwendeten Stämme

3.1.1.1 Bestimmung von Generationszeiten

Für Substanzen wie Chinolone oder β -Laktamantibiotika, die ihre bakterizide Wirkung in Abhängigkeit von aktiver Zellteilung entfalten, besteht eine positive Korrelation zwischen der Rate der Zellteilung und des Absterbens. Da Mutationen in den Genen der Topoisomerasen die Generationszeit eines Stamms beeinflussen können (15), wurde zunächst die Generationszeit der verwendeten Stämme gemäß 2.2.3 bestimmt.

Für *E. coli* WT (137) und die daraus durch *in vitro* Mutagenisierung hergestellten Stämme WT-4 (*parC*^{S80I}) (15) und WT-3-1 (*gyrA*^{S83L, D87G}) (14) wurden identische Generationszeiten ermittelt (Tab. 3-1). Ein Einfluss dieser Mutationen auf die Wachstumsphasen in einer Batchkultur war zudem nicht erkennbar.

Tabelle 3-1: Mit Resistenz gegenüber Chinolonen assoziierte Mutationen und Generationszeiten (g) von *E. coli* WT und isogenen Mutanten

Stamm <i>E. coli</i>	Mutationen			g [min]
	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>marCORAB</i>	
WT	–	–	–	16 ^a
WT-4	–	S80I	n.b.	16 ^b
MI	S83L	–	–	19 ^c
WT-3-1	S83L, D87G	–	–	16 ^b
M III	S83L, D87G	S80I	<i>marR</i> Δ74 bp	32 ^c
M III-300	S83L, D87G	S80I	<i>marR</i> Δ74 bp	19 ^c

^a Mittelwert aus 8 unabhängigen Bestimmungen, $\sigma = 1,2$; ^b in zwei unabhängigen Experimenten identisch zu WT bestimmt; ^c ($n \geq 2$), bestimmt durch A. Schulte (Dissertation, 2001)

Die *in vitro* selektierten Stämme MI (137) und M III-300 (299) wiesen mit 19 min eine signifikant ($p = 0,023$) verlängerte, M III (137) sogar eine verdoppelte Generationszeit gegenüber WT auf.

3.1.1.2 Empfindlichkeit gegenüber Topoisomeraseinhibitoren

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (siehe 2.2.6.1) verschiedener Topoisomeraseinhibitoren diente der Festlegung von subinhibitorischen, bakteriostatischen und bakteriziden Konzentrationen für die Verwendung in Absterbekinetiken und Genexpressionsstudien. Des Weiteren sollte der Einfluss der in den Stämmen vorhandenen Mutationen auf die Empfindlichkeit gegenüber diesen Hemmstoffen ermittelt werden. Tabelle 3-2 zeigt die in Mikrodilution bestimmte minimale Hemmkonzentration (MHK) ausgewählter Topoisomeraseinhibitoren, die zugleich der minimalen bakteriziden Konzentration (2.2.6.3) entsprach, welche nach 24 h zu einer Keimzahlreduktion von >99,9 % führte.

Tabelle 3-2: In Mikrodilution bestimmte MHK-Werte verschiedener Inhibitoren von Topo IV und Gyrase für *E. coli* WT und isogene Mutanten

Antibiotikum	MHK [$\mu\text{g/ml}$]			
	WT	WT-4	MI	WT-3-1
Pipemidsäure	2	1	16	16
Nalidixinsäure	2	2	256	64
Norfloxacin	0,125	0,0625	1	1
Ciprofloxacin	0,0156	0,008	0,5	0,25
Moxifloxacin	0,125	0,125	1	0,5
Novobiocin	64	32	64	64
Rutin	>1024	>1024	>1024	>1024
Etoposid	>1024	>1024	n.b.	>1024

Der Austausch von Aminosäuren in der A-Untereinheit von Gyrase ($\text{GyrA}^{\text{S83L}}$) bzw. ($\text{GyrA}^{\text{S83L, D87G}}$) bewirkte in den Stämmen MI bzw. WT-3-1 einen Anstieg der MHK je nach eingesetztem Chinolon um den Faktor 4 bis 32 (bei MI gegenüber Nalidixinsäure sogar um den

Faktor 128). Im Vergleich zu WT zeigte WT-4 eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Pipemidsäure, Norfloxacin, Ciprofloxacin und Novobiocin. Die Einzelmutante MI zeigte ihrerseits im Vergleich zur Doppelmutante WT-3-1 eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Nalidixinsäure, Ciprofloxacin und Moxifloxacin. Um diese in Mikrodilution ermittelten Empfindlichkeitsunterschiede zwischen MI und WT-3-1 einerseits und WT und WT-4 andererseits von nur einer Verdünnungsstufe, was dem Streuungsbereich der Methode entspricht, zu verifizieren, wurde die Empfindlichkeit gegenüber Norfloxacin und Ciprofloxacin zusätzlich über Gradientenplatten (2.2.6.2) bestimmt. Dieses Verfahren ermöglicht eine feinere Differenzierung der Empfindlichkeiten und bestätigte, wie Tabelle 3-3 zeigt, die in Mikrodilution ermittelten Unterschiede. Gegenüber Rutin und Etoposid wiesen alle Stämme eine verringerte Empfindlichkeit (MHK >1024 µg/ml) auf.

Tabelle 3-3: Über Gradientenplatten (2.2.6.2) bestimmte MHK-Werte

Antibiotikum	MHK [µg/ml]			
	WT	WT-4	MI	WT-3-1
Norfloxacin	0,054	0,01	0,6	0,6
Ciprofloxacin	0,008	0,0046	0,21	0,125

Um zu prüfen, ob die im Vergleich zu WT größere Empfindlichkeit von WT-4 gegenüber Novobiocin auf einer erhöhten Akkumulation der Substanz, z. B. durch einen verminderten Efflux, beruht, wurden alle Stämme auf die Empfindlichkeit gegenüber weiteren bekannten Substraten von Effluxpumpen (90, 227) getestet, von denen einige in Tabelle 3-4 erfasst sind.

Tabelle 3-4: Mittels Mikrodilutionsverfahren bestimmte MHK-Werte ausgewählter Substrate von Effluxpumpen für *E. coli* WT und isogene Mutanten

Antibiotikum	MHK [µg/ml]			
	WT	WT-4	MI	WT-3-1
Cefoxitin	8	2	8	8
Ticarcillin	4	2	4	4
Chloramphenicol	8	4	8	8
Tetracyclin	2	2	4	2
Gentamicin	0,5	0,5	1	0,5
Kanamycin	2	2	4	2
Streptomycin	4	4	8	4

Demnach wies WT-4 eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cefoxitin, Ticarcillin und Chloramphenicol sowie weiteren 17 Substanzen verschiedener Substanzklassen auf (Daten nicht gezeigt). Stamm MI war im Vergleich zu WT und WT-3-1 zweifach empfindlicher gegenüber Tetracyclin, den Aminoglycosiden Gentamicin, Kanamycin und Streptomycin sowie gegenüber weiteren acht Substanzen aus diesen zwei Klassen (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Wirkung von Fluorchinolonen

Die Wirkung eines Chinolons bzw. Fluorchinolons (Fluorrest an Position C-6, Abb. 3-1) ist einerseits abhängig von der intrazellulären Konzentration sowie den relativen Affinitäten zu Gyrase und Topo IV, andererseits aber auch von der Physiologie der Bakterienzelle. So erhöht sich die Wirkung mit steigender Anzahl an DNA-Topoisomerase-Komplexen, höherer Wachstumsrate und einer verringerten Fähigkeit zur Rekombination und Reparatur von DNA-Schäden (siehe 1.6). Mittels Absterbekinetiken (2.2.6.4) und mikroskopischer Analyse der Zellmorphologie (2.2.5) wurde daher die Wirkung dreier Fluorchinolone mit jeweils niedriger (Norfloxacin), mittlerer (Ciprofloxacin) und hoher Affinität (Moxifloxacin) zu Gyrase und Topo IV von *E. coli* (290) auf exponentiell wachsende und ruhende Kulturen untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen betragen Vielfache der jeweiligen MHK, um die ermittelten Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den Stämmen (3.1.1.2) auszugleichen. Um einen ausgeprägten bakteriziden Effekt zu erzielen, wurde meist das 8fache der MHK (Tabelle 3-2) verwendet – eine Konzentration, nahe der für viele Chinolone maximal bakteriziden Konzentration (122, 154).

Die zellulären Auswirkungen nach einer Hemmung von Topo IV wurden mit *E. coli* WT-3-1 untersucht, da dieser Stamm die gleiche Generationszeit wie WT aufweist (Tab. 3-1). Dieser Stamm ermöglichte zudem aufgrund seiner im Vergleich zu MI unempfindlicheren Gyrase Untersuchungen in Gegenwart höherer Konzentrationen von Inhibitoren der A-Untereinheit.

3.1.2.1 Fluorchinolonwirkung auf exponentiell wachsende Kulturen

In exponentiell wachsenden Kulturen bewirkten Fluorchinolone in 8facher MHK eine rasche Keimzahlreduktion innerhalb von 3 h, dessen Ausmaß in Abhängigkeit vom Nährmedium bestimmt wurde (Tab. 3-5, Abb. 3-2). In NI-Medium führte die Hemmung von Gyrase durch Ciprofloxacin nach 3 h zu einer Keimzahlreduktion von 4,3 Zehnerpotenzen und nach entsprechender Hemmung durch Norfloxacin zu einer etwas geringeren Reduktion von 3,8 Zehnerpotenzen. Die Hemmung von Topo IV durch Ciprofloxacin führte nach 3 h ebenfalls zu einer Keimzahlreduktion von 3,8 Zehnerpotenzen, während Norfloxacin wiederum eine geringere Reduktion ($-2,5 \log_{10}$ KBE/ml) verursachte.

Tabelle 3-5: Reduktion der Fähigkeit zur Koloniebildung* von exponentiell wachsenden Kulturen nach 3 h Inkubation mit Ciprofloxacin oder Norfloxacin in Abhängigkeit vom Nährmedium (N I- oder LB-Bouillon) und der gehemmten Zielstruktur.

Zielstruktur	Ciprofloxacin		Norfloxacin	
	N I	LB	N I	LB
Gyrase	-4,3	-3,2	-3,8	-2,3
Topo IV	-3,8	-2,3	-2,5	-2,3

* angegeben ist die Abnahme der KBE/ml in Zehnerpotenzen (\log_{10})

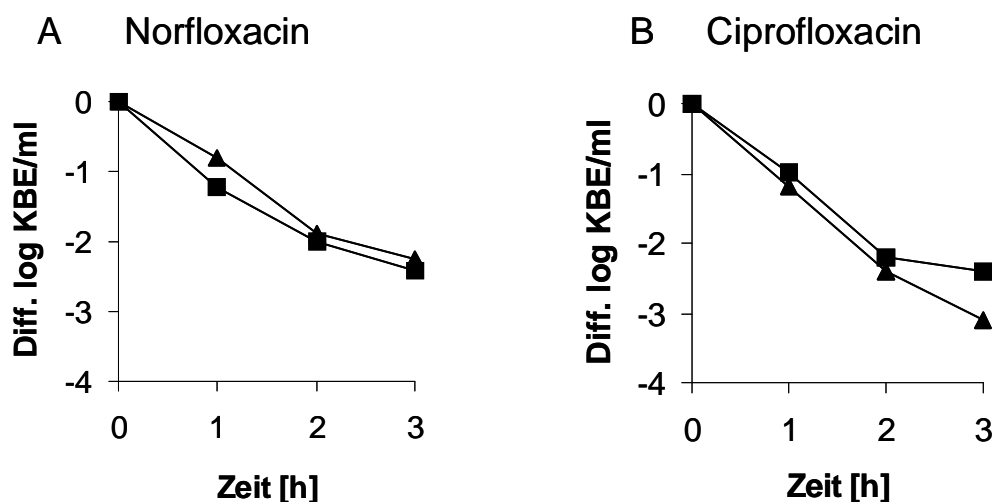


Abbildung 3-1: Verlust der Fähigkeit zur Koloniebildung in LB-Medium von WT-4 (▲) und WT-3-1 (■) nach Hemmung durch jeweils 8 x MHK Norfloxacin (A), und Ciprofloxacin (B), Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messreihen, ($\sigma \leq 0,3 \log_{10}$ KBE/ml)

In LB-Medium hingegen wiesen die Stämme eine um den Faktor 4 geringere Empfindlichkeit (gemessen als MHK) gegenüber Norfloxacin und Ciprofloxacin auf, so dass für die Absterbekinetiken eine entsprechend angepasste 8fache MHK verwendet wurde. Bei dieser Konzentration verursachte eine 3stündige Hemmung von Topo IV und Gyrase durch Ciprofloxacin sowie von Gyrase durch Norfloxacin jeweils eine um 1,1-1,5 Zehnerpotenzen geringere Reduktion der Keimzahl als in N I-Medium (Abbildung 3-1, Tab. 3-5). Die Hemmung von Topo IV durch Norfloxacin verursachte in LB-Medium hingegen die gleiche Keimzahlreduktion wie in N I-Medium (Tab. 3-5). Die ermittelten Standardabweichungen betragen für alle Zeitwerte $\leq 0,3 \log_{10}$.

Unabhängig vom verwendeten Nährmedium führte die Hemmung von Topo IV durch Ciprofloxacin zu einer geringeren Keimzahlreduktion als die entsprechende Hemmung von Gyrase (Tab. 3-5). Ebenfalls unabhängig vom Nährmedium verursachte Ciprofloxacin im Vergleich zu Norfloxacin eine stärkere Keimzahlreduktion nach Hemmung von Gyrase (Tab. 3-5).

Neben dem Verlust der Fähigkeit zur Koloniebildung zeigten beide Stämme unter Inkubation mit Norfloxacin, Ciprofloxacin und Moxifloxacin (jeweils MHK und 8 x MHK) bereits nach 20 min eine Verlängerung der Zellen, ein Anzeichen einer beginnenden Filamentierung. Nach 4 h Inkubation mit Ciprofloxacin oder Norfloxacin (jeweils 8 x MHK) wiesen beide Kulturen einen gleichen, geringen Filamentierungsgrad auf (Abbildung 3-2).

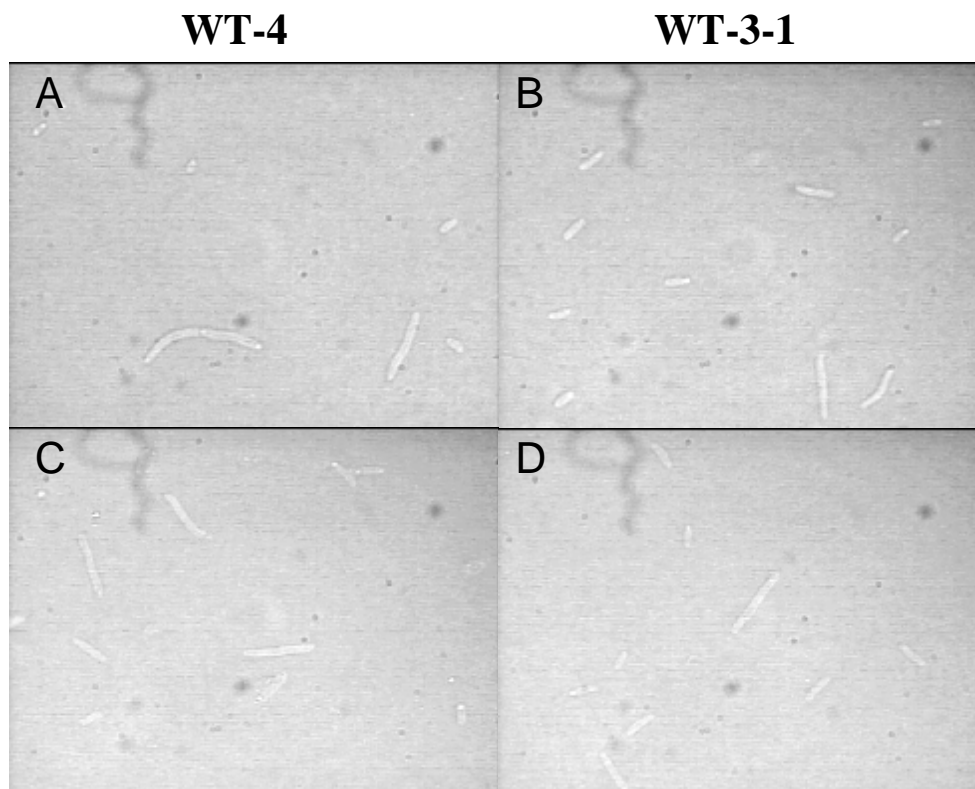


Abbildung 3-2: typische Zellmorphologie in LB-Medium 4 h nach Inkubation exponentiell wachsender Kulturen von WT-4 (A, C) und WT-3-1 (B, D) mit jeweils 8 x MHK Norfloxacin (A, B) und Ciprofloxacin (C, D)

Die typischen zellmorphologischen Veränderungen infolge einer Ciprofloxacineinwirkung auf Topo IV (32 x MHK) und Gyrase (8 x MHK) wurden über 3 h verfolgt und dokumentiert (Abbildung 3-3).

Während die Hemmung von Gyrase (WT-4) und Topo IV (WT-3-1) nach 30 min jeweils zu 2-3fach verlängerten Zellen führte, konnte nach 90 min ein stärkerer Filamentierungsgrad (4-5fache Zelllängen) nach Hemmung von Topo IV sowie in beiden Kulturen mittel- und endständige Vakuolen beobachtet werden. Zellen, in denen Gyrase gehemmt wurde, waren nach 180 min nur noch etwa 2fach verlängert und teilweise bereits lysiert (Zelltrümmer), während Zellen, in denen Topo IV gehemmt wurde, noch deutliche Filamentierung, Vakuolen und lediglich vereinzelt Anzeichen von Zelllysis zeigten.

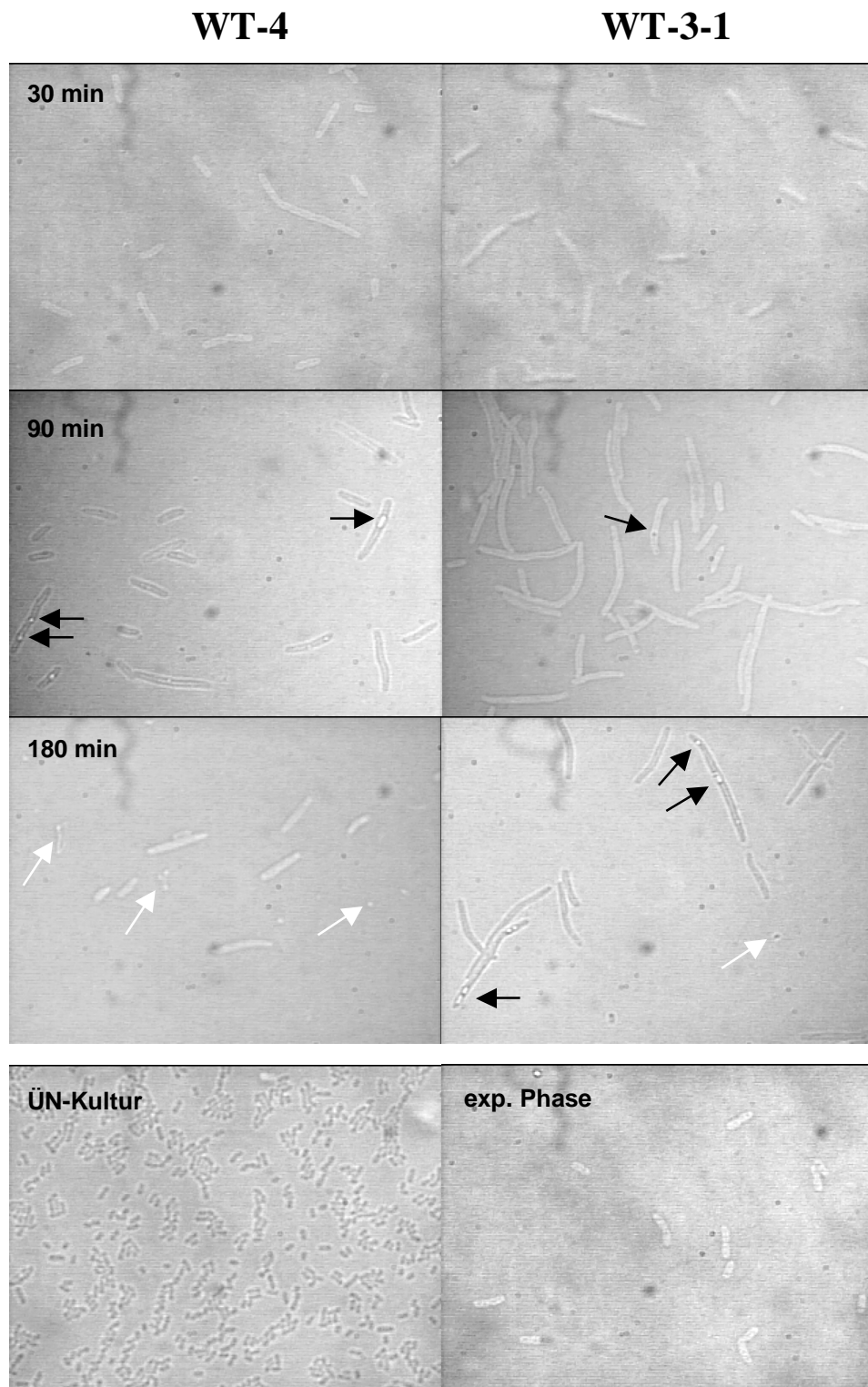


Abbildung 3-3: typische Zellmorphologie in LB-Medium nach 30, 90 und 180 min Inkubation exponentiell wachsender Kulturen von WT-4 und WT-3-1 mit Ciprofloxacin (8 x MHK für WT-4, 32 x MHK für WT-3-1); Zum Vergleich: typische Zellmorphologie in ÜN-Kulturen (12 h) und exponentiell wachsenden Kulturen von WT; weiße Pfeile, Zelltrümmer; schwarze Pfeile, Vakuolen

3.1.2.2 Fluorchinolonwirkung auf teilungsinaktive Kulturen

Fluorchinolone der Gruppe II (z. B. Ciprofloxacin, [239]) und vor allem Neuentwicklungen der Gruppe IV (z. B. Moxifloxacin) zeichnen sich durch eine hohe bakterizide Wirkung gegenüber teilungsinaktiven Kulturen aus (122, 188). Es wurde untersucht, welchen Anteil die Hemmung von Topo IV bzw. Gyrase an diesen bakteriziden Effekten besitzt. Da eine solche bakterizide Wirkung allerdings im Widerspruch zur angenommenen Wirkungsweise von Chinolonen steht, die sich auf teilungsaktive Zellen beschränkt (siehe 1.6), wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt eine Zellschädigung messbar ist. Ruhende, teilungsinaktive Kulturen von WT-3-1 und WT-4 wurden durch Behandlung mit Chloramphenicol, das durch Hemmung der Proteinbiosynthese die Produktion von Replikationsfaktoren verhindert, oder durch Entzug von Nährstoffen in Phosphat-gepufferter isotoner NaCl-Lösung (PBS) hergestellt (2.2.6.4). Beide Behandlungen führten bereits nach 30 min zu einer Bakteriostase, die ohne nennenswerte Veränderungen der Keimzahl über 8 h anhielt (Daten nicht gezeigt, bzw. Kontrolle in Abb. 3-5). Kulturen, die zuvor mit Chloramphenicol behandelt wurden, waren unabhängig von der gehemmten Zielstruktur nahezu unempfindlich gegenüber der Wirkung von 8 x MHK Norfloxacin und Ciprofloxacin (Abbildung 3-4 A, B). Demgegenüber waren in PBS kultivierte, teilungsinaktive Kulturen unter entsprechenden Konzentrationen teilweise empfindlicher: Dies galt für Kulturen von WT-4, die ebenfalls unempfindlich gegenüber Norfloxacin aber empfindlich gegenüber Ciprofloxacin ($-1,3\log_{10}$ KBE/ml nach 2 und 3 h Inkubation) waren (Abbildung 3-4 C, D). Moxifloxacin, dessen Wirkung auf teilungsinaktive Zellen nur in PBS getestet wurde, verursachte nach 3 h bei 8 x MHK eine Keimzahlreduktion von $>2\log_{10}$ in WT-3-1 und $>3\log_{10}$ in WT-4 (Abbildung 3-5). Mit zunehmender Einwirkzeit (0,5 h; 1 h und 3 h) von Moxifloxacin und Ciprofloxacin nahm die Fähigkeit zur Koloniebildung weiter ab (Abb. 3-4 D, 3-5, 3-6). Zusammen zeigten diese Ergebnisse, dass nach einer Hemmung von Topo IV durch verschiedene Fluorchinolone in teilungsinaktiven Kulturen, nur Moxifloxacin eine signifikante und mit der Inkubationsdauer zunehmende Keimzahlreduktion verursachte. Diese Reduktion fiel um eine Zehnerpotenz geringer aus, als nach der Hemmung von Gyrase. Ciprofloxacin zeigte hingegen nur eine geringe Wirkung auf teilungsinaktive Kulturen. Es verursachte eine geringe Keimzahlreduktion ($-1,3\log_{10}$ KBE/ml nach 2 h) lediglich nach Hemmung von Gyrase (in WT-4) jedoch nur in Kulturen, die in PBS, nicht aber in solchen, die mit Chloramphenicol inkubiert wurden. Norfloxacin zeigte in teilungsinaktiven Kulturen nach Hemmung von Gyrase oder Topo IV keinerlei keimreduzierende Wirkung.

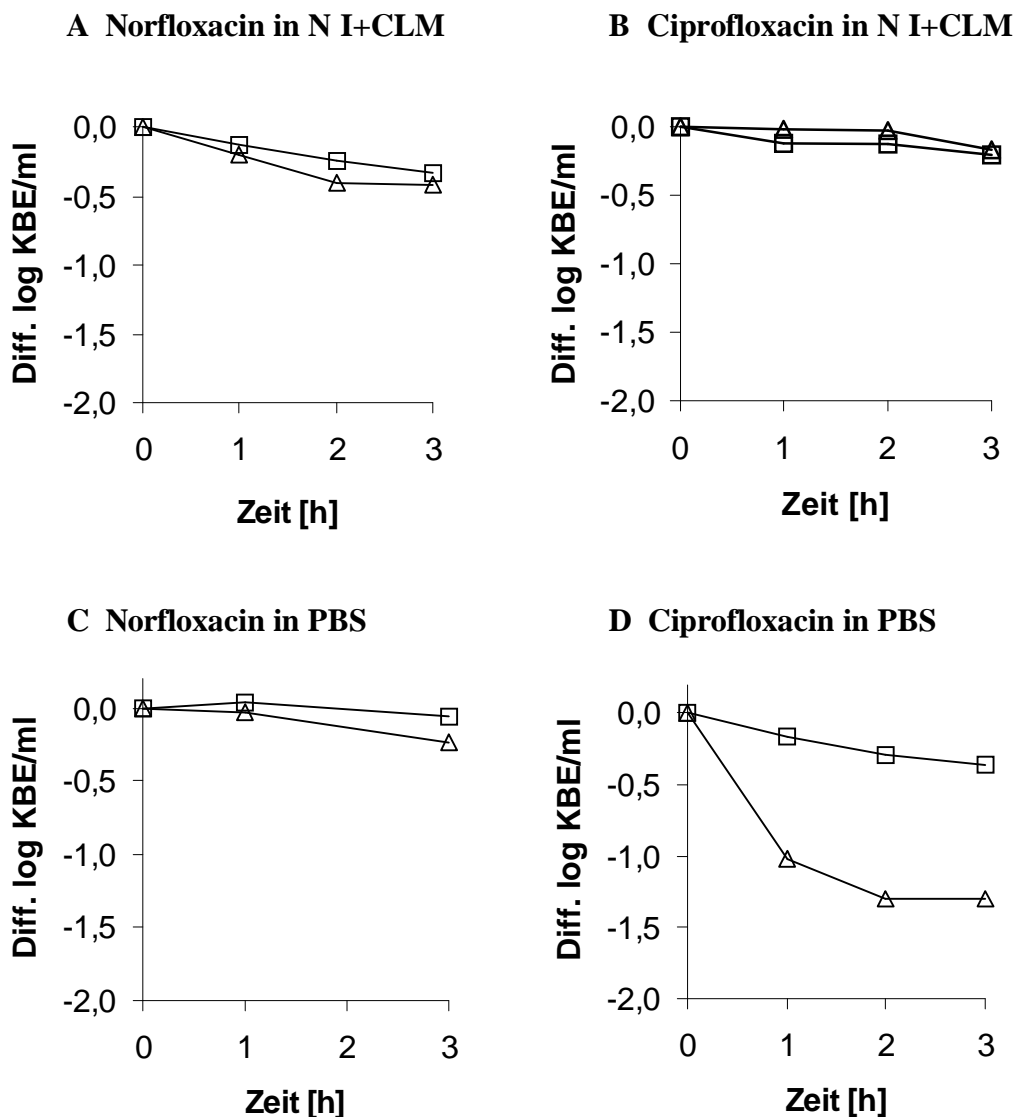


Abbildung 3-4: Reduktion der Fähigkeit zur Koloniebildung nach Hemmung teilungsinaktiver Kulturen von WT-4 (Δ) und WT-3-1 (\square) durch jeweils 8 x MHK Norfloxacin (A, C) und Ciprofloxacin (B, D). Die Herstellung teilungsinaktiver Kulturen erfolgte durch Behandlung mit CLM (A, B) oder durch Überführung in PBS (C, D).

Höhere Konzentrationen von Ciprofloxacin und Norfloxacin ab dem 256fachen der MHK, mit denen keine selektive Hemmung von Gyrase in WT-4 bzw. von Topo IV in WT-3-1 erreicht wird, führten zu einer stärkeren Keimzahlreduktion in teilungsinaktiven Kulturen von WT-4 und WT-3-1 (siehe Abbildung 3-6 und 3-7).

Alle teilungsinaktiven Kulturen wiesen unabhängig vom eingesetzten Fluorchinolon und dessen Konzentration über einen Zeitraum von 7,5 h weder Veränderungen der Zelldichte oder der Motilität noch Anzeichen von Filamentierung oder Zelllysis auf (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich daher die Frage, ob Zellschädigungen möglicherweise erst bei Wiederaufnahme der Teilungsaktivität verursacht werden. Hierzu wurde untersucht, ob in wieder anwachsenden Kulturen in antibiotikafreiem Medium eine Zellfilamentierung als Indiz für eine DNA-Schädigung auftritt. Teilungsinaktive Zellen in PBS (*E. coli* WT) wurden zunächst 1 h mit

4 x MHK Moxifloxacin oder Norfloxacin behandelt, dann nach mehrfachem Waschen in antibiotikumfreie NI-Bouillon überführt und nach bestimmten Zeitabständen mikroskopisch auf Filamentierung untersucht. Gegenüber der Kontrolle (ohne vorherige Chinolon-Behandlung) zeigten sich nach 1,5 h keine Veränderungen in der Zellmorphologie. Die zuvor mit Norfloxacin behandelte Kultur und die Kontrolle wiesen während weiterer 7 h keine Anzeichen von Filamentierung auf. Demgegenüber zeigte sich ein zunehmender Filamentierungsgrad in der zuvor mit Moxifloxacin behandelten Kultur. Nach 2,5 h waren etwa 10 % der Zellen deutlich verlängert (3fache Zelllänge). Nach 3,5 h wiesen etwa 60 % der Zellen eine Filamentierung (4-5fache Zelllänge) auf, während nach 8,5 h der Filamentierungsgrad wieder verringert war (10 % Filamente von 4-5facher Zelllänge und 40-50 % 2-3fach verlängerte Zellen).

Ein Hauptmechanismus zur Reparatur von Chinolon-induzierten DNA-Schäden stellt die homologe DNA-Rekombination dar (25, 92, 101, 157, 182), die in Zellen mit geringer Teilungsrate reduziert ist, da nur 1 bis 1,2 DNA-Kopien pro Zelle vorliegen (189). Für die hohe Wirksamkeit moderner Fluorchinolone werden schwer reparierbare DNA-Doppelstrangbrüche verantwortlich gemacht (85, 111, 143, 315). Es sollte daher untersucht werden, ob die durch Moxifloxacin-induzierten DNA-Schäden, möglicherweise nicht durch homologe Rekombination repariert werden. Hierzu wurde die Fähigkeit zur Koloniebildung von solchen Zellen untersucht, die nach einer 3stündigen Inkubation mit 8 x MHK Moxifloxacin in PBS bei Wiederaufnahme der Teilungsaktivität nur eine geringe Wachstumsrate (2.2.4) und damit eine verringerte Fähigkeit zur homologen Rekombination aufwiesen.

Abbildung 3-5 zeigt, dass in schnell wachsenden Kulturen, d. h. solche, die zur homologen Rekombination befähigt sind, nach Moxifloxacinzugabe viel weniger Zellen ihre Teilungsfähigkeit verlieren als in sehr langsam wachsenden Kulturen: Im Falle von WT-4 sind es 80 % weniger, im Falle von WT-3-1 65 % weniger Zellen.

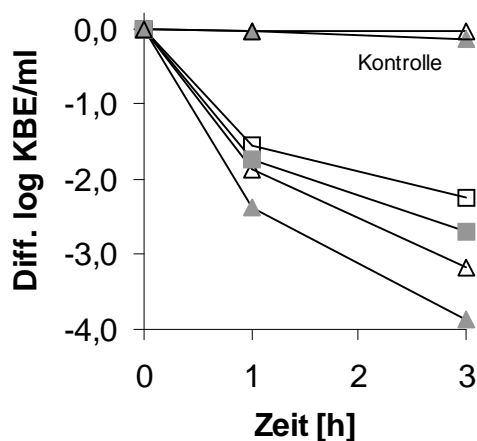


Abbildung 3-5: Fähigkeit zur Koloniebildung von WT-4 (Dreiecke) und WT-3-1 (Quadrate), nach Inkubation mit 8 x MHK Moxifloxacin für 1 h bzw. 3 h in PBS, in Abhängigkeit unterschiedlicher Wachstumsraten nach Wiederaufnahme der Teilungsaktivität; offene Symbole, Koloniewachstum bei 37 °C auf NI-Agar; graue Symbole, Koloniewachstum bei 24,5 °C auf 1/2 x NI-Agar, Kontrolle, Inkubation ohne Moxifloxacin

3.1.2.3 Fluorchinolonwirkung in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Beim Eintreten von Bakterienkulturen in die stationäre Phase vollziehen sich eine Reihe von morphologischen und physiologischen Veränderungen. Hierzu zählen neben der Abnahme des Zellvolumens und der Komprimierung des Bakterienchromosoms auch eine Veränderung der Genexpression (162). So nimmt die Expression der meisten Proteine ab (167). Da die Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber Chinolonen positiv mit der Konzentration an Typ II Topoisomerase korreliert (182, 355, 355), sollte untersucht werden, welche Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen zwischen Zellen aus der exponentiellen und aus der stationären Wachstumsphase einer Batchkultur von WT-3-1 bzw. WT-4 bestehen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert und vor dem Zusatz von Chinolonen zunächst für 2 h in PBS inkubiert (2.2.6.4), um direkte Effekte von unterschiedlichen Wachstumsraten auf die Chinolonempfindlichkeit auszuschließen. Zellen aus der exponentiellen bzw. aus der stationären Wachstumsphase von WT-3-1 und WT-4 unterschieden sich nicht in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin und Norfloxacin im Bereich von 2 x MHK bis 128 x MHK (Daten nicht gezeigt). Unter höheren Konzentrationen (250 µg/ml), von denen anzunehmen ist, dass sie in WT-3-1 und WT-4 eine kollektive Hemmung von Gyrase und Topo IV bewirken, konnte jedoch ein solcher Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3-6).

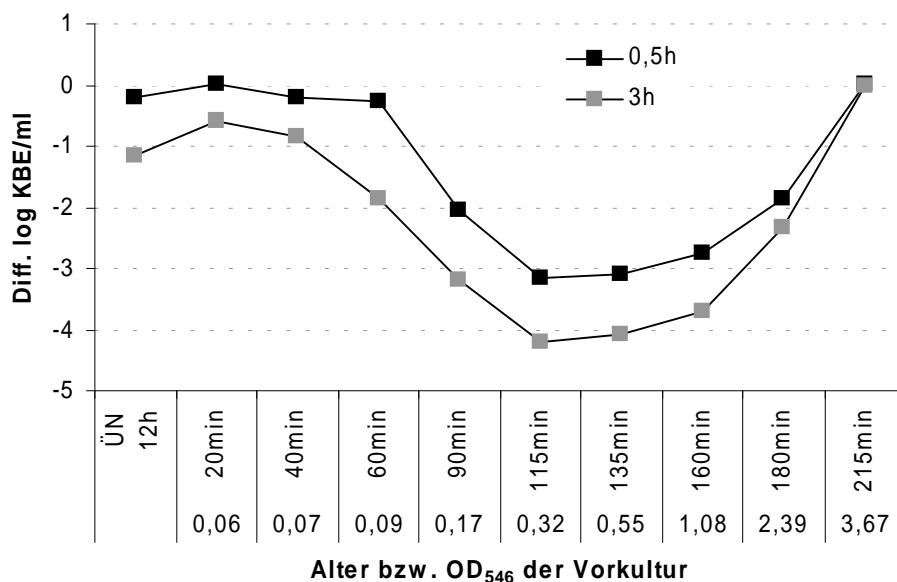


Abbildung 3-6: Reduktion der Fähigkeit zur Koloniebildung nach Inkubation teilungsinaktiver Kulturen (in PBS) von WT-3-1 für 0,5 h (■) und 3 h (▣) mit Ciprofloxacin (250 µg/ml) in Abhängigkeit vom Alter bzw. von der Wachstumsphase der Vorkultur.

Abbildung 3-6 zeigt, dass Zellen, die aus der mittleren exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{546} = 0,32$ und $0,55$) einer Vorkultur von WT-3-1 stammten, nach 30 min Inkubation mit Ciprofloxacin (250 µg/ml $\hat{=}$ 1000 x MHK) zu >99,9 % ihre Teilungsfähigkeit verloren. Zellen

aus der lag-Phase oder der mittleren ($OD_{546} = 3,67$) und späten stationären Phase (ÜN-Kultur) zeigten hingegen nahezu keinen Verlust ihrer Teilungsfähigkeit und waren somit etwa 800fach weniger sensibel. Eine längere Inkubationszeit (3 h gegenüber 30 min) mit Ciprofloxacin (1000 x MHK) führte – nahezu unabhängig von der vorangegangenen Wachstumsphase – zu einer etwa 10fach stärkere Reduktion der Teilungsfähigkeit. Lediglich Zellen aus der mittleren stationären Phase ($OD_{546} = 3,67$) wiesen nach 3 h Inkubation mit Ciprofloxacin keine stärkere Reduktion der Teilungsfähigkeit auf.

Zellen, die aus der exponentiellen Phase einer Batchkultur stammen, bedürfen einer stärkeren Anpassung ihres Stoffwechsels an einen Nährstoffmangel als bereits angepasste Zellen aus der stationären Phase. Diese Anpassung erfordert eine Neusynthese bestimmter Proteine, und die damit verbundenen zusätzlichen Transkriptionsprozesse könnten die Empfindlichkeit für Chinolone erhöhen (354). Um diesen möglichen Einfluss auszuschließen, wurde exponentiell wachsenden Kulturen bereits 1 h vor ihrer Überführung in PBS Chloramphenicol zugesetzt und die Kulturen vor Zugabe von Ciprofloxacin über 2 h in PBS + CLM (50 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Chloramphenicol hemmt die Translation und unterdrückt infolge der hierdurch fehlenden Transkriptions- und Replikationsfaktoren zusätzlich die Initiation der Transkription und Replikation (231).

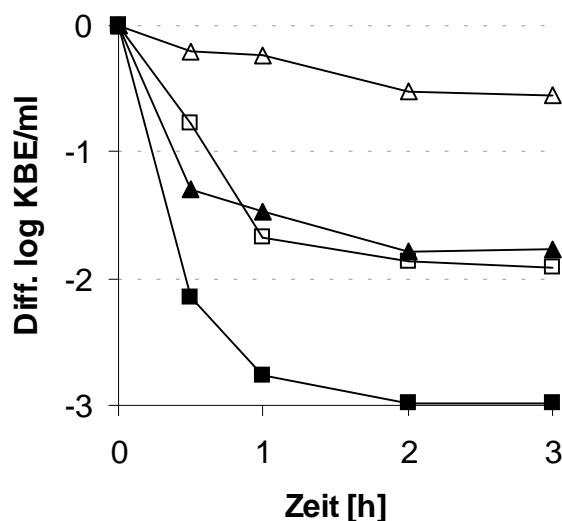


Abbildung 3-7: Reduktion der Fähigkeit zur Koloniebildung nach Inkubation einer zuvor exponentiell wachsenden Kultur (WT-3-1 bzw. WT-4) in PBS mit Ciprofloxacin in Abhängigkeit von zusätzlich gehemmter Proteinbiosynthese; die CiprofloxacinKonzentrationen betragen 1000 x MHK für WT-3-1 (Quadrate) und 128 x MHK für WT-4 (Dreiecke); offene Symbole, +CLM (50 $\mu\text{g/ml}$)

Das Ergebnis dieser Untersuchung gibt Abb. 3-7 wieder: Chloramphenicol reduzierte die bakterizide Wirkung hoher CiprofloxacinKonzentrationen auf Wachstums-inaktive Zellen von WT-3-1 und WT-4, die einer exponentiell wachsenden Batchkultur entstammten, um etwa 90 %. Zusammen genommen zeigen die Ergebnisse aus Abb. 3-6 und 3-7, dass Zellen, die aus der exponentiellen Phase einer Batchkultur von WT-3-1 stammen, unabhängig von Replikation, Transkription und Proteinbiosynthese eine etwa 90fach größere Empfindlichkeit gegenüber

hohen Ciprofloxacinkonzentrationen aufweisen, als Zellen aus der stationären Wachstumsphase. Um eine mögliche Korrelation zwischen diesen unterschiedlichen Empfindlichkeiten und den Konzentrationen an Topo IV oder Gyrase beziehungsweise den entsprechenden Mengen der *parC*-, *parE*- und *gyrA*-Transkripte aufzuzeigen, wurden die Transkriptmengen in Kulturen aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase untersucht (3.2.6.1.1).

3.1.3 Wirkung von Etoposid

Das Epipodophyllotoxin Etoposid wird in der Krebstherapie als Inhibitor der humanen Topoisomerase II eingesetzt, zu der Topo IV eine höhere Homologie als Gyrase aufweist. Nach Daten von Strumberg (127) ist die *In vitro*-Wirkung von Etoposid auf isolierte Gyrase eines *E. coli* Wildtyp-Stammes schwächer als auf eine Gyrase mit der Chinolonresistenzmutation Ser83-Trp (*GyrA*^{S83W}). Durch vergleichende Absterbekinetiken wurde daher untersucht, ob ein derartiger Empfindlichkeitsunterschied zwischen verschiedenen Gyraseenzymen für Etoposid auch *in vivo* zu beobachten ist, oder ob unter diesen Bedingungen Topo IV eine zusätzliche Zielstruktur für Etoposid darstellt.

Wegen der schwachen Aktivität von Epipodophyllotoxinen auf bakterielle Gyrase und der natürlicher Resistenz von *E. coli* gegenüber Etoposid, die auf eine hohe Affinität zu bakteriellen Effluxpumpen zurückzuführen ist (Tabelle 3-2 und Tabelle 3-6), musste für die Empfindlichkeitstestung die intrazelluläre Konzentration von Etoposid erhöht werden. Hierzu sollte eine Mutante (*TolC*⁻) verwendet werden, der mit *TolC* eine essentielle Komponente der RND-Typ Effluxpumpen in der äußeren Membran fehlte. In diese Mutante sollte die *gyrA*^{S83W}-Mutation durch homologe Rekombination eingekreuzt werden.

3.1.3.1 Herstellung von *gyrA*^{S83W}-Mutanten

Die Herstellung von *gyrA*^{S83W}-Mutanten erfolgte wie unter 2.2.23 und 2.2.23.1 beschrieben durch Einkreuzen der *gyrA*^{S83W}-Mutation mittels homologer Rekombination in den Wildtyp RFM443. Für die homologe Rekombination wurde zunächst der Suicide-Vektor pMAK705-242 (siehe Abb. 2-2) konstruiert, der ein *gyrA*-Fragment mit der *gyrA*^{S83W}-Mutation beinhaltet. Der so konstruierte Stamm (RFM443-242.1), dessen chromosomale *gyrA*^{S83W}-Mutation durch DNA-Sequenzierung bestätigt wurde, war ebenso unempfindlich gegenüber Ciprofloxacin (Tab. 3-6) wie WT-3-1 (Tab. 3-2). Es gelang jedoch nicht, entsprechende *gyrA*^{S83W}-Derivate der *tolC*⁻-Mutante DE112 zu selektieren. Um die Wirkung von Etoposid dennoch testen zu können, wurden Versuche in Kombination mit dem Inhibitor von Effluxpumpen des RND-Typs (EPI) Phe-Arg-β-Naphtylamid (MC-207,110) durchgeführt (3.1.3.2).

3.1.3.2 Sensitivierung von Wildtyp und *gyrA*-Mutante für Etoposid

Die Verwendung einer *tolC*⁻-Mutante oder der Zusatz von MC-207,110 führte zu einer Sensitivierung gegenüber Etoposid und bereits bekannten Substraten von RND-Effluxpumpen (z. B. Chloramphenicol und Ciprofloxacin). Die *tolC*⁻-Mutante wies im Vergleich zum Wildtyp eine 512fach höhere Sensitivität gegenüber Etoposid, eine etwa 8fach höhere Sensitivität gegenüber Ciprofloxacin und eine 16fach höhere Sensitivität gegenüber Chloramphenicol auf (Tabelle 3-6). MC-207,110 bewirkte konzentrationsabhängig ebenfalls eine Sensitivierung gegenüber Etoposid, Ciprofloxacin und Chloramphenicol, die aber je nach Substrat um den Faktor 2 – 6 geringer ausfiel als in der *tolC*⁻-Mutante (Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von Ciprofloxacin, Chloramphenicol und Etoposid, auch unter Zusatz von 40-320 μ M MC207,110 (MC₄₀₋₃₂₀) gegenüber Wildtyp (RFM443), *gyrA*^{S83W}-Mutante (RFM443-242.1) und *tolC*⁻-Mutante (DE112)

Antibiotikum	MHK [μ g/ml]		
	RFM443	RFM443-242.1	DE112
Etoposid	>1024	>1024	2
Etoposid+MC ₄₀	200	90	n.b.
Etoposid+MC ₁₆₀	42	≤18	n.b.
Etoposid+MC ₃₂₀	≤12	≤12	n.b.
Ciprofloxacin	0,0156	0,25	0,002
Ciprofloxacin+MC ₄₀	0,0156	0,25	n.b.
Ciprofloxacin+MC ₁₆₀	0,008	0,125	n.b.
Chloramphenicol	8	8	0,5
Chloramphenicol+ MC ₄₀	1	1	n.b.
MC	>640 ^a	>640 ^a	n.b.

^a Konzentration in μ M

3.1.3.3 Auswirkungen einer *gyrA*^{S83W}-Mutation auf die Empfindlichkeit gegenüber Etoposid und Ciprofloxacin

Durch Zugabe einer geeigneten subinhibitorischen Konzentration des EPI MC-207,110 (40 μ M) konnte die Empfindlichkeit von Wildtyp und Mutante derart gesenkt werden, dass vergleichende Untersuchungen zum Absterbeverhalten unter Etoposid möglich wurden. Die Bestimmung der MHK von Etoposid (Tab. 3-6) ergab, dass die *gyrA*-Mutante RFM443-242.1 etwa 2-3fach empfindlicher als der Wildtyp ist. In Absterbekinetiken (Abbildung 3-8) konnte gezeigt werden, dass die Chinolonresistenzmutation Ser83-Trp (*GyrA*^{S83W}) (135, 361) auch *in vivo* zu einer Hypersensitivität gegenüber Etoposid führt, während sich RFM443 (Wildtyp-*GyrA*) empfindlich gegenüber dem Chinolon Ciprofloxacin, aber unempfindlich gegenüber Etoposid zeigte. Wie bereits für Fluorchinolone gezeigt (3.1.2.1), verursachte auch Etoposid in Konzentrationen nahe der MHK in exponentiell wachsenden Kulturen von Wildtyp und *gyrA*-Mutante eine starke Filamentierung der Zellen (Daten nicht gezeigt), als Zeichen einer Induktion

der SOS-Antwort.

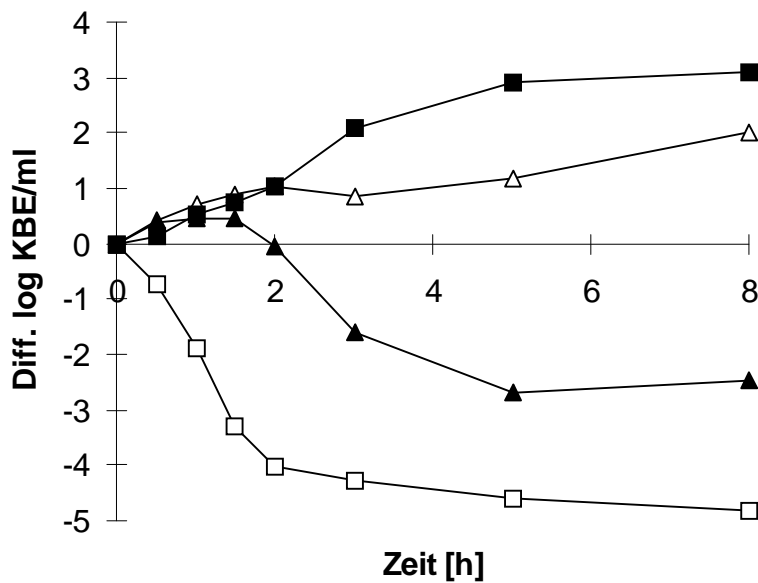


Abbildung 3-8: Veränderung der Fähigkeit zur Koloniebildung von RFM443 (offene Symbole) und RFM443-242.1 (gefüllte Symbole) nach Inkubation mit 63 µg/ml Etoposid (▲, △) oder 0,08 µg/ml Ciprofloxacin (■, □) jeweils in Kombination mit 40 µM MC-207,110.

3.1.4 Wirkung von Rutin

Für Rutin, ein glykosyliertes Flavon, wurde *in vitro* eine Wirkung auf isolierte Topo IV von *E. coli* bei fehlender Wirkung auf Gyrase beschrieben (26). Da jedoch Erkenntnisse über die Wirkung auf Zellen fehlen, sollten die Auswirkungen von Rutin auf die Lebensfähigkeit und die Zellmorphologie von WT, WT-4 und WT-3-1 untersucht werden. Die gemessene Unempfindlichkeit der Bakterienstämme gegenüber Rutin (Tab. 3-2) konnte weder durch den Effluxpumpeninhibitor MC-207,110 verringert werden, noch zeigte sich eine erhöhte Empfindlichkeit der *tolC*⁻-Mutante DE112 (Daten nicht gezeigt). Um die Wirkung von Rutin dennoch untersuchen zu können, wurde versucht die Empfindlichkeit der Zellen durch eine Permeabilisierung durch Polymyxin B Nonapeptid (PMBN) in subinhibitorischer Konzentration zu erhöhen (2.2.6.1). Die Zugabe von PMBN (75 µg/ml) hatte keinen Einfluss auf das Zellwachstum (Trübungsmessung) oder die Fähigkeit zur Koloniebildung, bewirkte jedoch die Bildung von Zellketten mit bis zu 16 einzeln beweglichen Zellen (Daten nicht gezeigt). Durch PMBN wurde eine Sensitivierung der Zellen für Rutin erzielt, die zu einer zunehmenden Wachstumshemmung ab 128 µg/ml (Abbildung 3-9) führte. Stämme mit Wildtyp-Topo IV (WT und WT-3-1) wurden durch Rutinkonzentrationen von 128, 256 und 512 µg/ml stärker im Wachstum gehemmt als die Topo IV-Mutante WT-4 (ParC^{S80I}). Die maximale Wachstumshemmung (Zunahme der KBE/ml um etwa 1,2 log 10 nach 18 h), entsprechend der MHK, erfolgte für die Stämme WT und WT-3-1 bei 512 µg/ml und für WT-4 bei 1024 µg/ml.

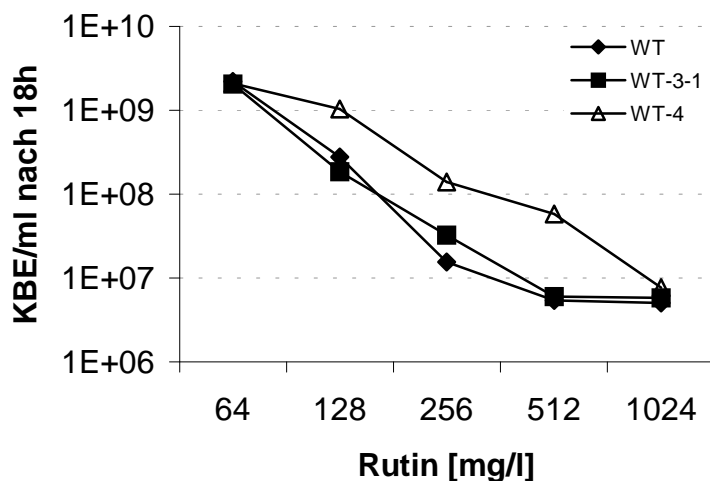


Abbildung 3-9: Wachstumshemmung von WT (◆), WT-3-1 (■) und WT-4 (△) durch verschiedene Rutinkonzentrationen jeweils in Kombination mit PMBN (75 µg/ml) nach 18 h; Ausgangsinokulum jeweils etwa 5E+05 KBE/ml

Eine bakterizide Wirkung von Rutin konnte auch bei 2 x MHK weder auf WT noch auf WT-3-1 festgestellt werden.

Die mikroskopische Analyse der Zellmorphologie nach 18stündiger Inkubation mit Rutin zeigte eine Zunahme des Filamentierungsgrads mit steigender Konzentration. Bei 128 µg/ml waren etwa 5 % der Zellen einer *E. coli* WT-Kultur filamentiert (4-5fache Zelllänge) mit Ausbeulungen der Zellhülle (Daten nicht gezeigt). Nach Inkubation mit 256 µg/ml zeigten >50 % der Zellen dieser Kultur eine entsprechende Filamentierung, etwa 5 % der Zellen von WT-3-1, jedoch keine Zellen von WT-4. Bei einer Inkubation mit 512 µg/ml zeigten alle Stämme eine deutliche Filamentierung (>66 %) und einige Zellen zentral oder endständig gelegene Beulen sowie vereinzelte Extrusionen von Zytoplasma an den Septen (Daten nicht gezeigt). Rutin bewirkte demnach mit steigender Konzentration zunächst eine Filamentierung in Kulturen von WT, dann von WT-3-1 und schließlich von WT-4, entsprechend der geringsten Empfindlichkeit dieses Stamms.

3.1.5 Wirkung von Novobiocin

Novobiocin, ein Cumarinderivat, bindet annähernd kompetitiv zu ATP (die Bindestellen überlappen sich) an die B-Untereinheit von Gyrase und Topo IV. Mutationen in der A-Untereinheit, wie sie in WT-3-1 und WT-4 vorhanden sind, haben vermutlich keine Auswirkung auf die Bindung von Novobiocin (125, 174, 223).

Der Einfluss von Novobiocin auf das Wachstum, die Teilungsfähigkeit und die Morphologie der Zellen wurde in LB-Bouillon untersucht. Hier war im Gegensatz zu Kationen-adjustierter MH-Bouillon (siehe Tab. 3-2) die Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Novobiocin wie auch gegenüber Ciprofloxacin (siehe 3.1.2.1) um den Faktor 4 verringert. Die in LB-Bouillon bestimmte MHK von Novobiocin betrug für WT-3-1 und WT 4 jeweils 256 µg/ml. Aus

Abbildung 3-10 geht hervor, dass bereits subinhibitorische Novobiocinkonzentrationen von $1/16 \times \text{MHK}$ das Kulturwachstum beider Stämme verlangsamt (Generationszeiten von etwa 47 min, bestimmt aus dem in Abb. 3-10 dargestellten Wachstum über 5 h). Konzentrationen von $1/8 \times$ und $1/4 \times \text{MHK}$ verursachten in beiden Stämmen über 5 h eine Bakteriostase bzw. eine geringe Reduktion der Keimzahl (max. $-0,8 \log_{10}$) gefolgt von einem verlangsamt exponentiellen Wachstum (Abbildung 3-10).

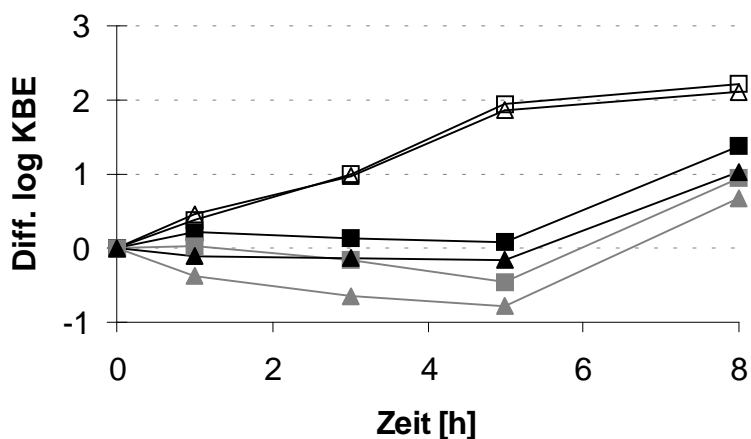


Abbildung 3-10: Reduktion der Fähigkeit zur Koloniebildung von WT-4 (Dreiecke) und WT-3-1 (Quadrate) durch Inkubation mit subinhibitorischen Novobiocinkonzentrationen über 8 h; $1/16 \times \text{MHK}$ (offene Symbole), $1/8 \times \text{MHK}$ (schwarze Symbole) und $1/4 \times \text{MHK}$ (graue Symbole)

Die Auswirkungen von inhibitorischen Novobiocinkonzentrationen auf die Fähigkeit zur Koloniebildung in beiden Stämmen sind in Abb. 3-11 dargestellt:

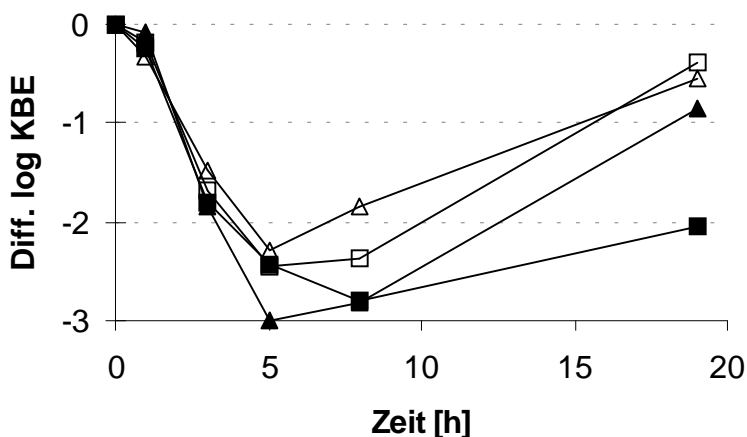


Abbildung 3-11: Reduktion der Fähigkeit zur Koloniebildung von WT-4 (\blacktriangle , \triangle) und WT-3-1 (\blacksquare , \square) durch Inkubation mit inhibitorischen Novobiocinkonzentrationen über 19 h; $256 \mu\text{g/ml}$ (offene Symbole) oder $512 \mu\text{g/ml}$ (geschlossene Symbole)

In Anwesenheit von Konzentrationen im Bereich der MHK ($256 \mu\text{g/ml}$) reduzierte Novobiocin bereits nach 3 h signifikant die Fähigkeit zur Koloniebildung beider Stämme und verursachte nach 5 h eine Reduktion um etwa 2,4 Zehnerpotenzen. Nach 19stündiger Inkubation konnte in beiden Stämmen wieder eine um etwa 2 Zehnerpotenzen erhöhte Keimzahl gemessen werden,

so dass ein Nettoverlust von etwa 0,5 Zehnerpotenzen bestehen blieb. Eine höhere Konzentration (2 x MHK d. h. 512 µg/ml) verursachte in beiden Stämmen nach 5 h bzw. 8 h einen stärkeren Verlust (etwa 3 Zehnerpotenzen) der Fähigkeit zur Koloniebildung und reduzierte zudem in WT-3-1 nach 19stündiger Inkubation die erneute Zunahme der Keimzahl von 2 auf etwa 0,7 Zehnerpotenzen. Konzentrationen von 4 x MHK und 8 x MHK verringerten dauerhaft (bis 22 h) die Fähigkeit zur Koloniebildung in beiden Stämmen um mehr als 4 Zehnerpotenzen (Daten nicht gezeigt).

Die mikroskopische Analyse der Zellmorphologie von WT zeigte bereits nach 30minütiger Inkubation mit Novobiocinkonzentrationen von 16 und 32 µg/ml in etwa 10 % der Zellen eine Verlängerung bis zum 3fachen der normalen Zelllänge (Abbildung 3-12). Diese Zunahme der Zelllängen spiegelte sich auch in einer Zunahme der OD₅₆₀ bei gleichzeitig unveränderter Keimzahl (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zur Wirkung von Fluorchinolonen trat nach 2 h keine weitere Verlängerung der Zellen auf (Abbildung 3-12). Der Anteil der verlängerten Zellen betrug nach 2 h und 8 h etwa 50 % und verringerte sich nach 19 h wieder auf <10 %. Kulturen, die mit 64 µg/ml und 128 µg/ml Novobiocin inkubiert wurden, wiesen erst nach 19 h verlängerte Zellen in geringer Konzentration (etwa 1 %) auf. Novobiocinkonzentrationen von 256 µg/ml und 512 µg/ml führten in WT, WT-4 und WT-3-1 auch nach 21,5 h zu keiner Zellverlängerung jedoch nach 25,5 h zu einem Anteil von etwa 50 % verlängerter Zellen.

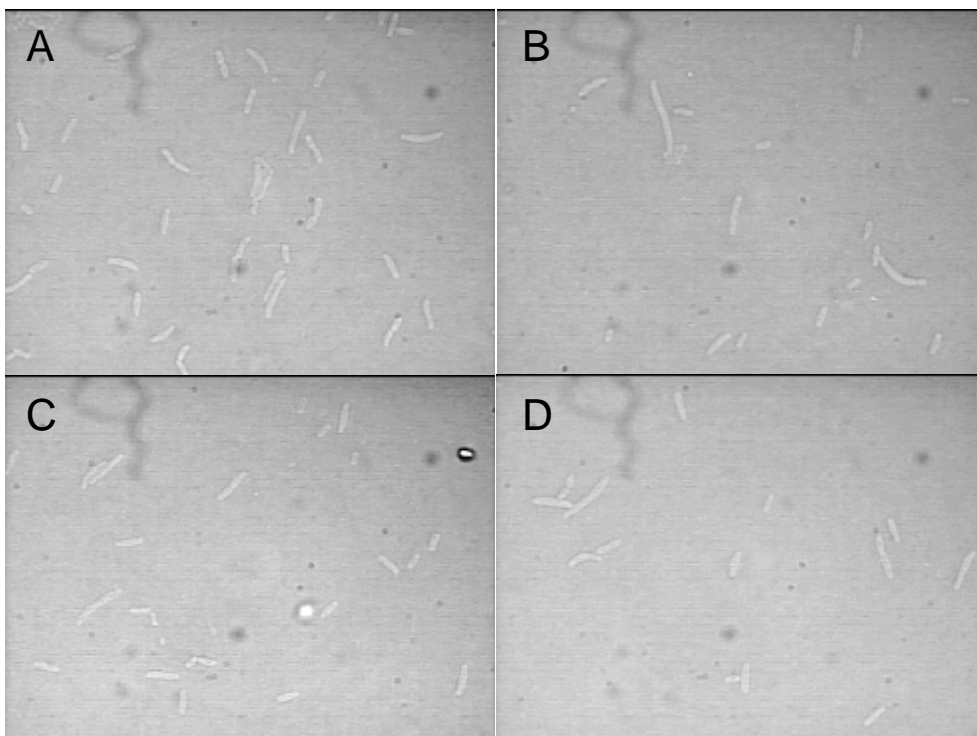


Abbildung 3-12: Typische Zellmorphologie von WT nach 30 min (A, B) und 2 h (C, D) Inkubation mit Novobiocin 16 µg/ml (A, C) und 32 µg/ml (B, D)

3.2 Regulation der Transkription von *parC* und *parE*

In Bakterien wird die Menge der meisten Proteine hauptsächlich über die Kontrolle der Transkription reguliert. Da Topo IV aufgrund ihrer relaxierenden Aktivität als Antagonist von Gyrase an der Aufrechterhaltung des globalen DNA-Überspiralisierungsgrads beteiligt ist (365), erschien eine Regulation der Transkription von *parC* und *parE* durch den Überspiralisierungsgrad wie bei *gyrA/B* denkbar. Um erste Hinweise auf die vorhandenen Promotoren und ihre Regulation zu erhalten, wurden zunächst die Startpunkte der mRNAs bestimmt und mögliche DNA-Bindestellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt. Für weitere Einblicke in die Regulation der Transkription von *parC* und *parE*, wurden die entsprechenden Transkripte unter verschiedenen physiologischen Bedingungen, die modulierend auf den Überspiralisierungsgrad einwirken, mittels real-time RT-PCR quantifiziert. Als Kontrolle für eine gleichbleibende Expression über verschiedene Wachstumsphasen einer Batchkultur wurde das Transkript der RNA-Helicase *SrmB* gewählt, die an der Biogenese von Ribosomen beteiligt ist. Array-basierte Genexpressionsstudien zeigten eine identische Expression von *srmB* in exponentieller und stationärer Wachstumsphase (302). Zusätzlich wurde die Transkriptmenge von *agaY* bestimmt, das verstärkt in der stationären Phase exprimiert wird. Es codiert für Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase, die im alternativen Kohlenhydratstoffwechsel am Abbau von N-Acetyl-Galactosamin und D-Galactosamin beteiligt ist (42).

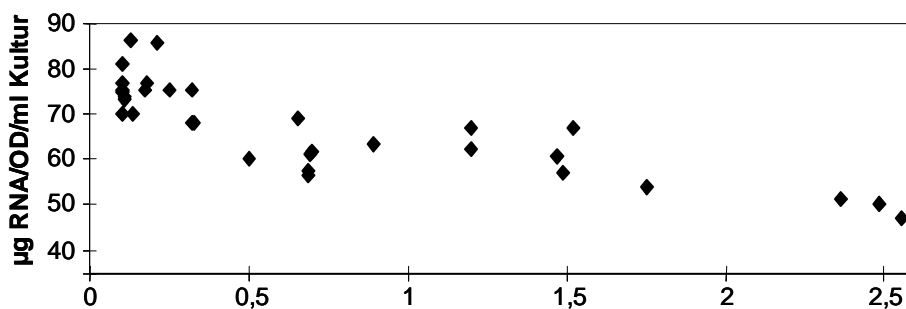
3.2.1 RNA-Isolierung und RNA-Ausbeuten

Die Isolierung und Quantifizierung von Gesamt-RNA erfolgte wie unter 2.2.8 und 2.2.9 beschrieben. Zwischen den beiden zur Quantifizierung verwendeten Methoden, nämlich der Bestimmung der Absorption bei 260 nm (siehe 2.2.9) oder der unter 2.2.10 beschriebenen Messung eines gebundenen, spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs (RiboGreen[®]), wurden keine Unterschiede festgestellt (Daten nicht gezeigt). Für alle RNA-Quantifizierungen wurde daher die Zeit und Kosten sparende Absorptionsmessung bei 260 nm verwendet.

Die Kontamination der Gesamt-RNA mit genomischer DNA (Negativkontrolle in real-time RT-PCRs) betrug trotz DNase-Behandlung (siehe 2.2.8) maximal 0,1 % bei Präparationen aus der exponentiellen Wachstumsphase und je nach Gen zwischen 5 % und 30 % bei Präparationen aus der späten stationären Phase (15 h).

3.2.1.1 RNA-Ausbeute: Schwankungsbreite und Abhängigkeit von der optischen Dichte der Kultur

Die Ausbeuten verschiedener, identisch durchgeführter RNA-Präparationen aus Batchkulturen von WT unterschiedlicher optischer Dichte wurden miteinander verglichen. Wie Abb. 3-13 zeigt, variierten die RNA-Ausbeuten in Abhängigkeit von der Zelldichte (OD_{560}) derart, dass sich drei



	OD ₅₆₀		
µg RNA/OD/ml Kultur	0,10 - 0,33	0,5 - 1,5	1,75 - 2,55
arithmetisches Mittel	75,4	62,0	50,8
Standardabweichung	5,4	4,1	2,9
% Variationskoeffizient	7,1	6,6	5,8
n	16	12	4

Abbildung 3-13: Abhängigkeit der RNA-Ausbeuten [$\mu\text{g RNA/OD/ml Kultur}$] von der optischen Dichte einer Batchkultur von WT; Die angrenzende Tabelle zeigt die zugehörigen mittleren RNA-Ausbeuten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten

OD_{560} -Bereiche mit jeweils unterschiedlichen RNA-Ausbeuten identifizieren ließen. Die höchsten RNA-Ausbeuten von durchschnittlich $75,4 \mu\text{g/OD/ml Kultur}$ wurden im Bereich einer OD_{560} von 0,1-0,33 erzielt. Verglichen hiermit wurden im OD-Bereich von 0,5-1,5 noch 82 % und im OD-Bereich von 1,75-2,55 noch 67 % der RNA-Ausbeuten erzielt. Innerhalb dieser drei OD-Bereiche waren die Ausbeuten reproduzierbar mit Variationskoeffizienten zwischen 5,8 % und 7,1 %.

3.2.1.2 RNA-Ausbeute: Einfluss von Topoisomerase-Inhibitoren

Ciprofloxacin und Novobiocin beeinflussten unterschiedlich die RNA-Ausbeuten aus Batchkulturen. So lieferten Kulturen von WT, die mit bakteriostatischen Ciprofloxacin-konzentrationen behandelt wurden, über 60 min Inkubation, bzw. bis zu einer $OD_{560} = 0,74$, annähernd gleiche RNA-Ausbeuten von etwa $70 \mu\text{g RNA/OD/ml Kultur}$ (Abb. 3-14). Bakteriostatische Novobiocinkonzentrationen ($16\text{-}64 \mu\text{g/ml}$) bewirkten hingegen einen sofortigen Zellteilungsstopp – eine Veränderung der Keimzahl/ml konnte nach 30 min nicht festgestellt werden – und eine nahezu vollständige Hemmung der RNA-Synthese innerhalb von 30 Minuten ($\mu\text{g RNA/ml Kultur}$ blieb fortan konstant). Wie aus Abb. 3-14 ersichtlich, reduzierten sich daher die RNA-Ausbeuten von Novobiocin-behandelten Kulturen nach 30 min auf 85 % und nach 60 und 90 min auf etwa 66 %.

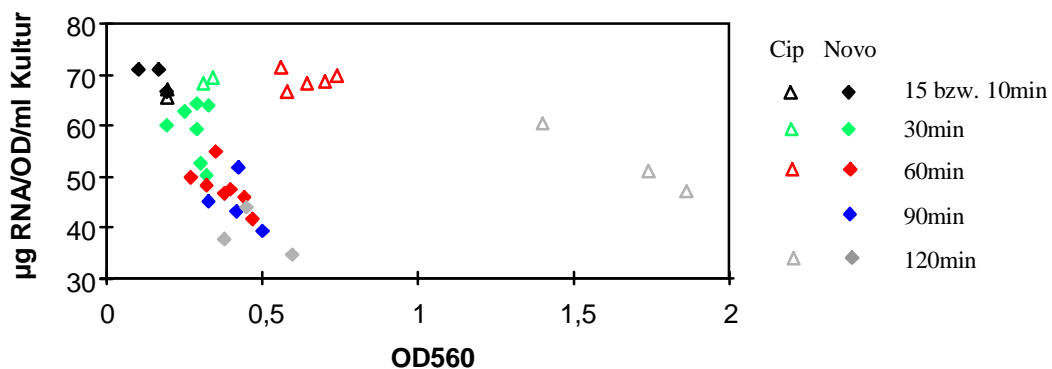
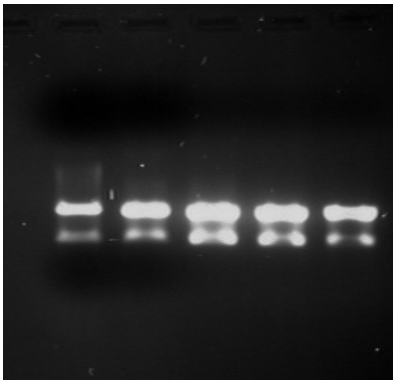


Abbildung 3-14: Einfluss bakteriostatischer Konzentrationen von Novobiocin und Ciprofloxacin auf die RNA-Ausbeuten aus Batchkulturen von *E. coli* WT; Für die Präparationen sind die Zeiten der Probenentnahme angegeben.

Zusammengenommen zeigten die Ergebnisse aus 3.2.1.1 und 3.2.1.2, dass der RNA-Gehalt einer Kultur stark von den Kulturbedingungen bzw. vom Zellwachstum abhängt und nicht mit der optischen Dichte der Kultur korreliert. Für Genexpressionsstudien, bei denen verschiedene Kulturbedingungen mit Einfluss auf das Zellwachstum verglichen werden, können daher nur definierte Mengen Gesamt-RNA verwendet werden, da eine Normalisierung unterschiedlicher RNA-Mengen mittels der optischen Dichte nicht möglich ist.

3.2.1.3 Reinheits- und Qualitätsprüfung der RNA

Die Reinheit der präparierten Gesamt-RNA wurde mittels des Verhältnisses der Absorptionswerte bei 260 nm/280 nm überprüft (2.2.11). Für alle RNA-Präparationen lagen die Verhältnisse zwischen 1,87 und 2,16, charakteristisch für eine proteinfreie RNA. Für eine effiziente reverse Transkription und anschließende Amplifikation sollten die mRNAs möglichst unfragmentiert (in hoher Qualität) vorliegen. Da jedoch für die Quantifizierung der cDNAs (2.2.15.2) nur kurze Sequenzabschnitte (50-250 bp) in der Nähe des 3' Endes amplifiziert wurden, würde auch eine partiell degradierte mRNA äquivalente Quantifizierungsergebnisse liefern (48). Die Qualität der präparierten Gesamt-RNA wurde in einem nativen Agarosegel anhand der rRNA-Banden überprüft (2.2.12). Unfragmentierte RNA zeichnet sich durch zwei



stringente rRNA-Banden im nativen Agarosegel aus, von denen die obere 23S rRNA-Bande etwa die doppelte Intensität der unteren 16S rRNA-Bande besitzt und zudem keine Anzeichen einer Degradierung erkennbar sind. Alle RNA-Präparationen erfüllten diese Kriterien für unfragmentierte RNA, wie Abbildung 3-15 exemplarisch anhand von fünf RNA-Präparationen zeigt.

Abbildung 3-15: natives Agarosegel von typischen RNA-Präparationen nach DNase-Verdau

3.2.2 Reverse Transkription

Da RNA nicht als Template in einer PCR dienen kann, erfolgte als erster Schritt einer quantifizierenden real-time RT-PCR die unter 2.2.15.1 beschriebene reverse Transkription (RT) von mRNA in cDNA.

3.2.2.1 Effizienz und Effizienzschwankungen

Eine gleichbleibende Effizienz der RT-Reaktion ist eine Voraussetzung für die akkurate Quantifizierung der mRNA, da die Menge der produzierten cDNA die eingesetzte RNA-Menge exakt widerspiegeln muss. Die meisten kommerziell erhältlichen Reverse Transkriptase-Enzyme sind temperaturempfindlich, so dass die RT-Reaktion häufig bei Temperaturen zwischen 40 °C und 50 °C durchgeführt wird. Bei diesen Temperaturen kann es in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung und Nukleotidanzahl der verwendeten Primer zu unspezifischen Anlagerungen an die DNA kommen. Es können sich auch Sekundärstrukturen ausbilden, die zu einem Abbruch der reversen Transkription führen können (48, 57). Zusätzlich kann die Salzkonzentration oder eine Kontamination mit Alkoholen oder Phenolen die Effizienz der RT-

Reaktion beeinflussen und zu Schwankungen zwischen 5 % - 90 % führen (99).

Vorversuche zur vorliegenden Arbeit zeigten den Einfluss folgender Faktoren auf die relative und absolute cDNA-Ausbeute: Art des verwendeten RT-Enzyms, Methode des Primings – zufällige Hexamernukleotide oder genspezifische Primer (GSPs) (Daten nicht gezeigt).

Für reproduzierbare und vergleichende Quantifizierungen der Genexpression aus verschiedenen RNA-Präparationen muss daher die RT-Effizienz möglichst konstant gehalten oder Effizienzschwankungen berücksichtigt werden. Zum Ausgleich solcher Effizienzschwankungen werden häufig Referenzgene (interne Standards) eingesetzt. Diese sind bei Prokaryonten nur sehr eingeschränkt von Nutzen, da die Genexpression in Bakterien nicht unter allen physiologischen Bedingungen gleich stark ist. Dies trifft auch auf die in einigen Studien verwendeten Gene für die 16S rRNA zu, deren Expression in Abhängigkeit von der Wachstumsrate reguliert wird (6). Für vergleichende Untersuchungen der Genexpression unter verschiedenen physiologischen Bedingungen (verschiedene Wachstumsphasen einer Batchkultur, Antibiotikazusatz, etc.) lassen sich daher womöglich keine geeigneten Referenzgene finden.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher keine Referenzgene verwendet, sondern mögliche Schwankungen in der Effizienz der RT-Reaktion durch konstante Reaktionsbedingungen minimiert. Hierzu wurden alle RT-Reaktionen im gleichen Thermocycler, mit einheitlichem Temperaturprofil sowie unter Verwendung eines Mastermixes mit konstanten Konzentrationen an RT-Enzym, Puffer, RNase-Inhibitor, dNTPs und Primern sowie konstanter RNA-Mengen (jeweils 150 ng) in einem Volumen von je 20 µl angesetzt.

Obgleich die RT-Effizienz nicht direkt durch eine mögliche radioaktive Markierung bestimmt wurde, deutet die hohe Reproduzierbarkeit von Genexpressionsdaten aus verschiedenen RNA-Präparationen (Tabelle 3-8) indirekt auf eine geringe Variabilität der RT-Effizienz. Die Bestimmung von cDNA-Mengen mittels real-time PCR zeigte zudem keinen Einfluss der Denaturierungszeit und Templatmenge und nur einen geringen Einfluss der Verlängerungszeit auf die Effizienz der RT-Reaktion (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Quantifizierende real-time PCR

Die Quantifizierung eines spezifischen cDNA-Templates erfolgte relativ zu einer geeigneten Kontrolle wie unter 2.2.15.2 und 2.2.15.3 beschrieben.

3.2.3.1 Optimierung und Validierung

Für jede Template/Primer Kombination erfolgte zuerst eine Optimierung der PCR-Bedingungen hinsichtlich maximaler Effizienz bei minimaler Bildung von unspezifischen PCR-Produkten (z. B. Primerdimere). Hierzu wurden geeignete Primerkonzentrationen (im Bereich 50-900 nM) und MgCl₂-Konzentration (im Bereich 3-4,25 µM) ausgetestet. Tabelle 3-7 gibt die optimalen Konzentrationen für den Forward- und Reverse-Primer sowie die PCR-Effizienz (2.2.15.2) für alle getesteten Amplikons an. Die Amplifikation unterschiedlicher Templatemengen wurde im Bereich von 0,08–80 ng cDNA getestet und erfolgte für alle Templates mit hoher Konstanz (lineare Abhängigkeit $R \geq 0,98$) und annähernd identischer Effizienz nahe der maximalen theoretischen Effizienz von 2,0 (Verdopplung aller Templates pro PCR-Zyklus). Die Analyse der Amplikons auf einem Agarosegel (4 %) zeigte keinerlei Nebenprodukte und damit eine hohe Selektivität der PCRs.

Tabelle 3-7: optimale Primerkonzentrationen und Amplifikationseffizienz für die getesteten Amplikons.

Amplikon	optimale Primerkonz. [nM]		Effizienz
	Forward	Reverse	
<i>parC</i>	200	150	1,89±0,01
<i>parE</i>	150	150	1,83±0,03
<i>gyrA</i>	150	150	1,73±0,03
<i>recA</i>	150	150	1,86±0,06
<i>agaY</i>	300	450	1,96±0,10
<i>srmB</i>	150	75	1,97±0,05

Die Reproduzierbarkeit von PCR-Reaktionen wird von stochastischen Effekten, die durch das Poisson-Gesetz beschrieben werden, beeinflusst (73). Die Messungenauigkeit oder Varianz nimmt daher mit steigender Zyklenzahl bzw. geringerer Templatemenge zu (262).

Die Variabilität der gemessenen C_T-Werte innerhalb eines dreifachen PCR-Ansatzes (intra-Assay) betrug für alle Amplikons <0,7 % und für verschiedene PCR Ansätze von einer cDNA (inter-Assay) für *srmB* 1,5 %, für alle anderen Amplikons <0,6 % (Tab. 3-8).

Tabelle 3-8: % mittlerer Variationskoeffizient bei Amplifikationen durch real-time PCR.

Amplikon	% mittlerer Variationskoeffizient		
	intra-Assay	inter-Assay	relative Genexpression ^a
<i>parC</i>	0,47	0,59	9,8
<i>parE</i>	0,53	0,5	12,2
<i>gyrA</i>	0,49	0,55	7,9
<i>recA</i>	0,38	0,62	8,7
<i>agaY</i>	0,65	0,63	17,1
<i>srmB</i>	0,61	1,54	12,9

^a n = 65

Die Quantifizierung der cDNAs mittels SYBR[®] Green-PCR war somit sehr stabil und zeigte für alle Amplikons eine hohe Reproduzierbarkeit.

Der zusätzlich in Tab. 3-8 angegebene mittlere Variationskoeffizient der relativen Genexpression wurde über die Standardabweichung der relativen Genexpression, $SE_{x_{rel}}$ (siehe 2.2.15.3) berechnet. Er berücksichtigt insgesamt 65 unterschiedliche Paare von RNA-Präparationen einschließlich der sich anschließenden RT-Reaktion und real-time PCR. Die größte Variation von 17,1 % wurde dabei für das *agaY*-Amplikon festgestellt, das zugleich die höchsten C_T -Werte aufwies. Für die anderen Amplikons lag der mittlere Variationskoeffizient der relativen Genexpression zwischen 7,9 % und 12,9 %.

3.2.4 Lokalisierung der Transkriptionsstartpunkte von *parC* und *parE*

Die Lokalisierung der Transkriptionsstartpunkte erfolgte in *E. coli* WT mittels einer neu entwickelten Methode basierend auf der „Primer-Extension“-Analyse wie unter 2.2.16 beschrieben. Hierzu wurden Primer verwendet, die an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-fluorescein Phosphoamidite (6-FAM) markiert sind und etwa 50 bp stromabwärts des Translationsstarts an die mRNAs von *parC* bzw. *parE* binden (siehe Abb. 3-11 und 3-12). Durch die Verlängerung dieser Primer entstanden cDNA-Fragmente, deren 3'-Ende den jeweiligen Transkriptionsstartpunkt markiert. Diese wurden zusammen mit einem Längenstandard, bestehend aus unterschiedlich langen, am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxy-tetramethyl-rhodamin (TAMRA) markierten DNA-Fragmenten, durch eine Kapillarelektrophorese getrennt und ihre Länge im Vergleich zum Längenstandard über die Laufzeiten der Proben berechnet. Da die Laufeigenschaften von denaturierter DNA im verwendeten POP-6-Polymer jedoch auch sequenzabhängig sind (7), war eine Validierung dieser Längenbestimmung erforderlich. Die Validierung erfolgte mit Größenstandards definierter Länge (siehe Tab. 2-4), die mittels PCR unter Verwendung der 6-FAM markierten Primer aus den stromaufwärts liegenden Sequenzen von *parC* und *parE* generiert wurden. Die Länge dieser hergestellten Größenstandards wurde mittels des TAMRA-Längenstandards exakt bestätigt und damit die ermittelten Fragmentlängen der *parC*- und *parE*-cDNAs verifiziert.

Unter exponentiellem Wachstum ($OD_{560} = 0,62 - 0,69$) wurde das häufigste cDNA-Fragment von *parC* mit 103,2 nt bestimmt. Hieraus ergab sich für den Transkriptionsstart ein Guanin, 51 bp vor dem Translationsstart (Abbildung 3-16). Es wurden vier weitere Fragmente in geringerer Kopienzahl (maximal 10 %) detektiert (Tab. 3-9). In der frühen stationären Wachstumsphase ($OD_{560} = 1,49$) konnte nur ein cDNA-Fragment von 103,3 nt detektiert werden, entsprechend dem häufigsten Fragment unter exponentiellem Wachstum.

Tabelle 3-9: *parC*-Fragmente aus der „Primer-Extension“-Analyse

<i>parC</i>	Fragmentlänge [nt] ^a	relative Häufigkeit ^b	Fragmentlänge [nt] ^a	relative Häufigkeit ^b
	exponentielle Phase		frühe stationäre Phase	
Hauptfragment	103,2 (g)	1,00	103,3 (g)	n.b.
Nebenfragmente	96,2 (t)	0,09	–	–
	141,1 (c)	0,07		
	159,5 (gc)	0,10		
	178,7 (c)	0,07		

^a Mittelwerte aus 2 unabhängigen Bestimmungen

^b hierzu wurden die jeweiligen Peak-Flächen verglichen (7)

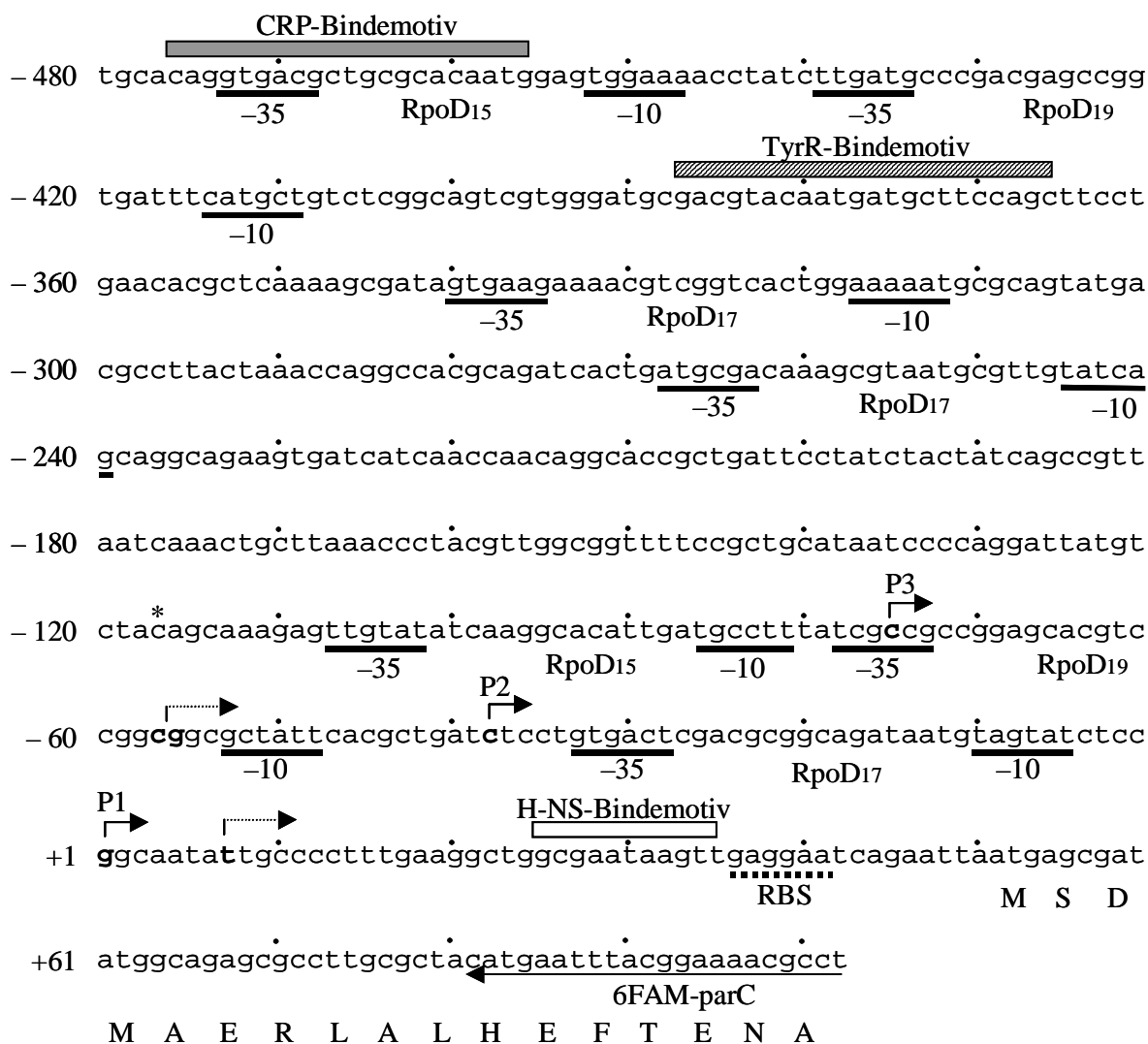


Abbildung 3-16: 5'-Region von *parC*; * Ende des für WT, WT-4, WT-3-1, MIII und MIII-300 sequenzierten DNA-Abschnitts (–118 - –480: *E. coli* K12-Sequenz), fettgedruckte Basen geben die experimentell bestimmten Transkriptionsstartpunkte wieder; gestrichelte Pfeile, Transkriptionsstartpunkte ohne proximale Promotorsequenzen; RpoD_n, σ^{70} -abhängiger Promotor mit n bp Abstand zwischen –10- und –35-Region; angegeben ist auch die Bindestelle des für die „Primer-Extension“ verwendeten 6-FAM-*parC*-Primers

Für *parE* wurde das häufigste cDNA-Fragment mit 102,7 nt bestimmt, woraus sich für den Transkriptionsstart ein Guanin, 55 bp vor dem Translationsstart ergab (Abb. 3-17). Es wurden

vier zusätzliche Fragmente in etwas geringerer Kopienzahl detektiert. Im Vergleich zum Hauptfragment betragen ihre relativen Häufigkeiten zwischen 23 % und 72 % (Tabelle 3-10).

Tabelle 3-10: *parE*-Fragmente aus der „Primer-Extension“-Analyse

<i>parE</i>	Fragmentlänge [nt] ^a	relative Häufigkeit ^b	Fragmentlänge [nt] ^a	relative Häufigkeit ^b
	exponentielle Phase		frühe stationäre Phase	
Hauptfragment	102,7 (g)	1,00	159,5 (at)	n.b.
Nebenfragmente	159,4 (at)	0,72	–	–
	178,4/179,1 (t)	0,60		
	288,2 (a)	0,25		
	ca. 380 (g)	0,23		

^a Mittelwerte aus 2 unabhängigen Bestimmungen

^b hierzu wurden die jeweiligen Peak-Flächen verglichen (7)

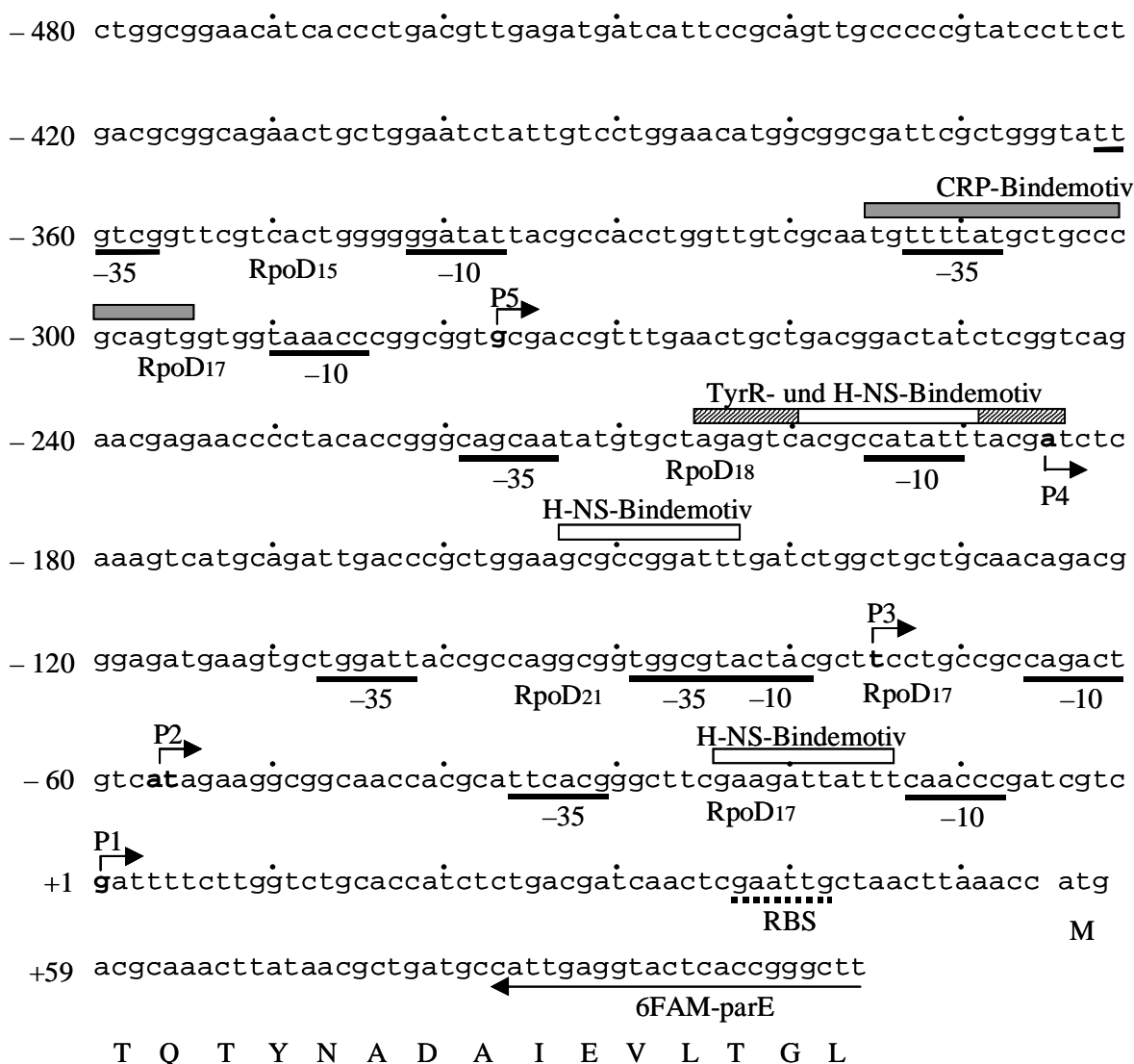


Abbildung 3-17: 5'-Region von *parE* der Stämme WT, WT-4, WT-3-1, MIII und MIII-300 (bis Position –604 sequenziert), fettgedruckte Basen geben die für WT experimentell bestimmten Transkriptionsstartpunkte wieder; RpoD_n, σ^{70} -abhängiger Promotor mit n bp Abstand zwischen –10 und –35-Region, angegeben ist auch die Bindestelle des für die „Primer-Extension“ verwendeten 6-FAM-*parE*-Primers

Unter Bedingungen der frühen stationären Wachstumsphase ($OD_{560} = 1,49$) wurde für *parE* ebenfalls nur ein Transkript detektiert, dessen Länge anders als bei *parC* nicht einem Start an P1, sondern einem Transkriptionsstart identisch zu P2 (Abbildung 3-17) entspricht.

3.2.5 DNA-Bindestellen für Transkriptionsfaktoren

Nach Lokalisation der Transkriptionsstartpunkte für *parC* und *parE* wurden die jeweils stromaufwärts liegenden Sequenzen mit einer Software-gestützten Analyse (284) hinsichtlich möglicher Bindestellen für RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktoren untersucht. Hierdurch konnten jeweils unmittelbar vor den primären Transkriptionsstartpunkten (P1) von *parC* und *parE* mögliche Bindemotive für σ^{70} -abhängige RNA-Polymerase (-10- und -35-Region) gefunden werden, die mit Ausnahme der -10-Region des P1 von *parE* eine hohe Homologie zur Konsensussequenz aufweisen (Score $\geq 2,67$ und 17 bp Abstand der Regionen, Tab. 3-11). Die -10- und -35-Region vor P1 von *parC* weist zudem eine hohe Homologie zum P3-Promotor von *topA* ([328], Tab.3-11) auf. Zusätzlich wurden vor weiteren zwei möglichen Transkriptionsstartpunkten von *parC* und allen anderen von *parE* ebenfalls putative Bindemotive einer σ^{70} -abhängige RNA-Polymerase gefunden (Tab. 3-11).

Tabelle 3-11: Vergleich der -10 und -35 Regionen der Promotoren P1-P3 (*parC*, Abb. 3-16) bzw. P1-P5 (*parE*, Abb. 3-17) mit dem σ^{70} -Konsensuspromotor und vorgeschlagenen Promotoren für *parC* (Peng & Marians 1993) und *parE* (Kato et al. 1990) sowie *topA* (Tse-Dinh & Beran 1988)

	σ^{70} abhängiger Promotor	-35-Region (Score ¹)	Spacer (bp)	-10-Region (Score ¹)	mRNA-Start	Abstand zu ATG ²
	Konsensus	TTGACA (5,25)	17	TATAAT (5,97)	<u>G</u> oder <u>A</u>	
<i>parC</i>	P1	<u>GTGACT</u> (3,41)	17	<u>TAGTAT</u> (3,49)	<u>G</u>	55
	P2	<u>TCGCCG</u> (0,62)	19	<u>GCTATT</u> (-1,19)	C	89
	P3	<u>TTGTAT</u> (3,37)	15	<u>TGCCTT</u> (-2,46)	C	127
	P _{Peng&Marians}	<u>TTGATC</u> (2,62)	22	<u>TAATGT</u> (2,57)	n.b.	60
<i>parE</i>	P1	<u>TTCACG</u> (2,67)	17	<u>CAACCC</u> (-2,82)	<u>G</u>	62
	P2	<u>TGGCGT</u> (-0,29)	17	<u>CAGACT</u> (1,83)	<u>A/T</u>	115
	P3	<u>TGGATT</u> (1,40)	21	<u>TACTAC</u> (-0,21)	T	133
	P4	<u>CAGCAA</u> (-1,71)	18	<u>CATATT</u> (2,68)	<u>A</u>	244
	P5	<u>TTTTAT</u> (2,07)	17	<u>TAAACC</u> (0,92)	<u>G</u>	339
	P _{Kato et al.}	<u>TTGGTC</u> (-0,55)	17	<u>TCAACT</u> (-0,63)	n.b.	32
<i>topA</i>	P3 _{Tse-Dinh & Beran}	<u>GTGACG</u> (2,63)	18	<u>TAGATT</u> (3,87)	<u>G</u>	205

¹ entsprechend der Basengewichtung (weight matrix) nach Hertz & Stormo (1996)

² Abstand (bp) zwischen -10-Region und Translationsstart

Die entsprechenden -10- und -35-Regionen der distalen Promotoren von *parC* weisen mit einem summierten Score ihrer Sequenz von -0,57 (P2) bzw. 0,91 (P3) und einem untypischen Abstand der Bindemotive (19 bp bzw. 15 bp) eine geringe Homologie zum Konsensuspromotor auf (Tab. 3-11). Diese geringe Homologie korreliert mit den nachgewiesenen relativ geringen

($\leq 10\%$) Transkriptmengen (siehe Tab. 3-9). Die putativen Promotoren der distalen Transkriptionsstartpunkte von *parE* weisen aufgrund der Sequenz und dem Abstand ihrer -10- und -35-Region (siehe Tab. 3-11) mit Ausnahme von P3 (21 bp Abstand) eine größere Homologie zum Konsensuspromotor auf (summierter Score von 1,54 [P2], 1,19 [P3], 0,97 [P4] bzw. 2,99 [P5]) und korrelieren ebenfalls mit Ausnahme von P3 mit den relativ hohen Transkriptmengen ($\geq 23\%$, Tab. 3-11). Die Sequenzen vor den Transkriptionsstartpunkten an den Positionen +8 und -56/57 der 5'-*parC*-Region gaben keine Hinweise auf effiziente Promotor-Elemente (z. B. -10- oder -35-Region).

Als Ribosomenbindungsstelle (RBS) wurde für *parC* die Sequenz GAGGAA mit einem Abstand von 9 bp zum Startcodon und für *parE* die Sequenz GAATTG mit 12 bp Abstand zum Startcodon postuliert (Abb. 3-16 und 3-17). Beide Sequenzen ermöglichen jeweils eine Bindung zu vier komplementären Basen des 3'-Endes der 16S rRNA (3'AUUCCUCCAC).

Die Software-gestützte Untersuchung der 5'-Regionen stromaufwärts von *parC* und *parE* hinsichtlich möglicher Bindestellen für Transkriptionsfaktoren ergab für *parC* jeweils ein Bindemotiv für TyrR (etwa 300 bp stromaufwärts von P3) und CRP (etwa 390 bp stromaufwärts von P3) sowie für H-NS, unmittelbar vor der postulierten RBS (Abb. 3-16 und 3-17). Für *parE* wurde ein CRP-Bindemotiv (überlappend zur -35-Region von P5), ein TyrR-Bindemotiv (überlappend zur -10-Region und dem Transkriptionsstart von P4) sowie insgesamt 3 mögliche Bindemotive für H-NS in den Promotorbereichen von P1 und P4 und im Promotor-freien Bereich zwischen P3 und P4 identifiziert.

3.2.6 Quantifizierung der Genexpression

Die Expression verschiedener Gene wurde durch Quantifizierung der jeweiligen mRNAs bestimmt. Für die Normalisierung unterschiedlicher RNA-Mengen erwies sich die optische Dichte der Kultur als ungeeignet, da der RNA-Gehalt einer Kultur stark von den Kulturbedingungen abhängt und nicht mit der optischen Dichte der Kultur korreliert (siehe 3.2.1.1 und 3.2.1.2). Für Genexpressionsstudien, die den Einfluss verschiedener Kulturbedingungen vergleichen, sollten daher definierte Mengen Gesamt-RNA verwendet werden.

Als gemeinsame Referenz aller Genexpressionsdaten (C_T -Werte) diene daher die in die RT-Reaktion eingesetzte Gesamt-RNA-Menge von 150 ng bzw. 1/100 Volumen cDNA-Template (15 ng/10 μ l) in der real-time PCR. Durch einheitliche Reaktionsbedingungen wurden Schwankungen der Effizienz auf ein Minimum reduziert.

Die Transkriptmengen wurden als relative Veränderungen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelte Kultur zum gleichen Zeitpunkt oder Ausgangskultur im Falle der Untersuchung unterschiedlicher Wachstumsphasen) gemäß 2.2.15.3 berechnet und zusammen mit der Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt.

3.2.6.1 Expression von *parC* und *parE*

3.2.6.1.1 Einfluss der Wachstumsphase

In einer Batchkultur von *E. coli* ist exponentielles Wachstum limitiert. Abnehmende Substratkonzentrationen und zunehmende Konzentrationen an toxischen Stoffwechselprodukten lassen ein Wachstum nur bis zu einer Zelldichte von etwa 5×10^9 KBE/ml zu. In der folgenden stationären Phase ändert sich die Zelldichte kaum, jedoch muss der bakterielle Stoffwechsel durch eine veränderte Genexpression an die neuen Umweltbedingungen angepasst werden. Es sollte untersucht werden, inwieweit diese Anpassung auch die Expression der Topo IV-Gene *parC* und *parE* und des Gens für die Gyrase-A Untereinheit, *gyrA*, beeinflusst. Hierzu wurden die Transkriptmengen bei unterschiedlichen Kulturdichten in exponentieller und stationärer Phase in Relation zur $OD_{560} = 0,1$ bestimmt. Als Kontrolle für eine erhöhte Transkription in der stationären Phase diente *agaY* und für eine von der Wachstumsphase unabhängige Genexpression *srmB* (siehe 3.2).

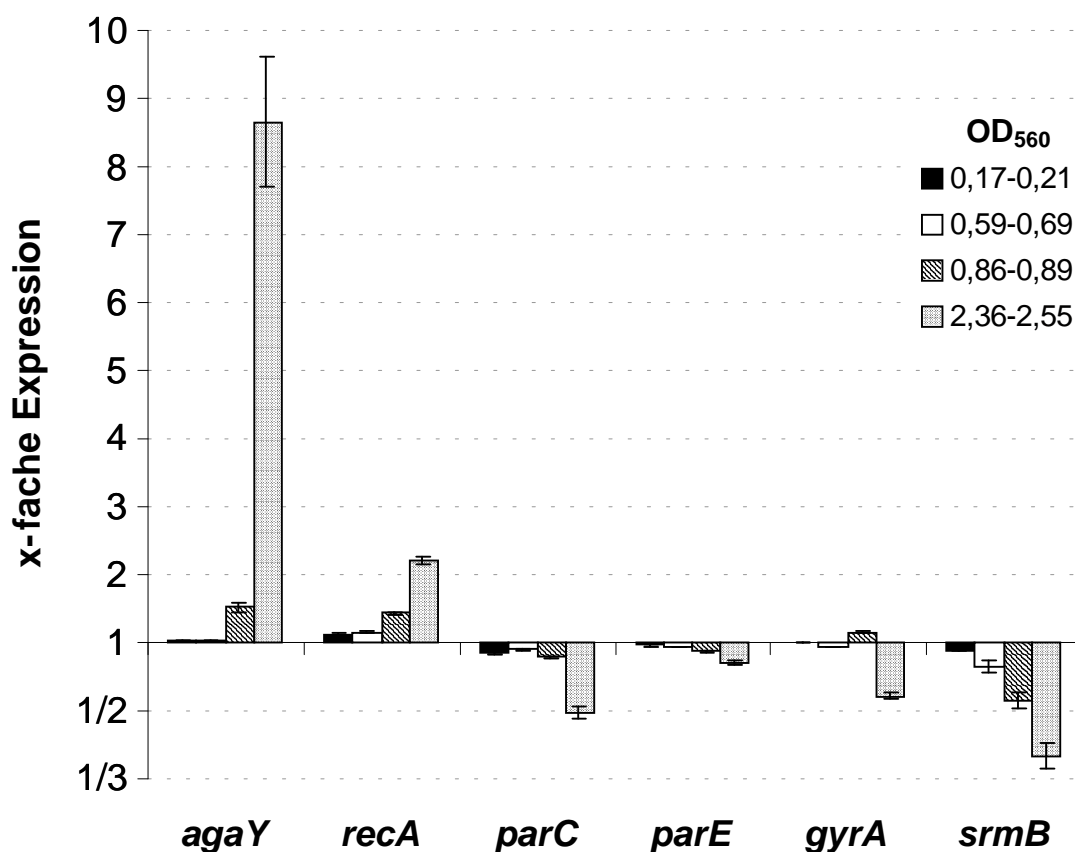


Abbildung 3-18: Änderungen der Genexpression in einer Batchkultur von *E. coli* WT gegenüber der Expression bei $OD_{560} = 0,1$; Mittelwerte aus 3-4 unabhängigen Bestimmungen $\pm \Delta Ex_{rel}$

Wie aus Abbildung 3-18 ersichtlich, konnten innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{560} = 0,1-0,69$) einer Batchkultur von WT keinerlei signifikante Veränderungen ($p > 0,3$) in

der Expression von *agaY*, *parC*, *parE* und *gyrA* festgestellt werden. Im Vergleich zur frühen exponentiellen Phase ($OD_{560} = 0,1$) waren bei einer $OD_{560} = 0,69$ die Transkriptmengen von *recA* jedoch signifikant ($p < 0,01$) erhöht (115 %) und die von *srnB* signifikant vermindert (73 %).

In der späten exponentiellen Phase ($OD_{560} = 0,86-0,89$) stieg die Transkriptmenge von *agaY*, weiter an (143 %) und auch für das *recA*-Transkript konnte ein signifikanter und für das *gyrA*-Transkript ein schwach signifikanter ($p < 0,1$) Anstieg (115 %) gemessen werden. Die Menge des *parC*-Transkripts nahm hingegen statistisch signifikant auf 82 % ab, und auch für das *parE*-Transkript konnte eine schwach signifikante ($p < 0,1$) Abnahme gemessen werden. In der frühen stationären Phase ($OD_{560} = 2,36-2,55$) wiesen alle untersuchten Gene signifikante Veränderungen ihrer Transkriptmengen auf. Die deutlichste Veränderung konnte für das *agaY*-Transkript festgestellt werden, das eine Zunahme auf das 8,5fache ($p < 0,01$) erfuhr. Im Vergleich zur späten exponentiellen Phase nahm auch die Transkriptmenge von *recA* weiter signifikant ($p < 0,01$) auf das 2,2fache zu, während sich die Transkriptmengen von *parC* und *gyrA* signifikant ($p < 0,01$) auf etwa die Hälfte, die von *srnB* ($p < 0,01$) sogar auf fast ein Drittel reduzierten. Etwa 8 h nach Beginn der stationären Phase betrug die Transkriptmengen aller untersuchten Gene etwa 1/5 bis 1/10 der Menge, die in der frühen exponentiellen Phase vorlagen (Daten nicht gezeigt). Solche geringen Transkriptmengen wurden mit Ausnahme von *agaY* (Reduktion auf 50 %) auch nach einer 2stündigen Inkubation unter Nährstoffmangel in PBS festgestellt (Daten nicht gezeigt).

3.2.6.1.2 Einfluss des DNA-Überspiralisierungsgrads

Aufgrund der Beteiligung von Topo IV an der Aufrechterhaltung des globalen DNA-Überspiralisierungsgrads (365) erschien eine Regulation der Transkription von *parC* und *parE* durch den Überspiralisierungsgrad wie bei *topA* (327) oder *gyrA/B* (229) denkbar. Diese Annahme wurde durch die für *parC* und *parE* identifizierten Promotorregionen (siehe 3.2.4 und 3.2.5) gestützt und die gemessene Reprimierung von *parC* in der stationären Wachstumsphase (Abbildung 3-18) deutete ebenfalls auf eine Regulation durch einen in dieser Phase abnehmenden Überspiralisierungsgrad. Die mögliche Reprimierung der Expression von *parC* und *parE* infolge einer geringeren überspiralisierten DNA sollte daher nach Hemmung von Gyrase mittels Novobiocin und nach der Induktion eines Kälteschocks untersucht werden.

3.2.6.1.2.1 Effekt durch Novobiocin

Novobiocin verursacht durch Hemmung von Gyrase eine Relaxierung der DNA (83). Diese Relaxierung bewirkt kompensatorisch eine erhöhte Expression der Gene *gyrA* und *recA* (229, 307), die daher als Positivkontrollen dienen.

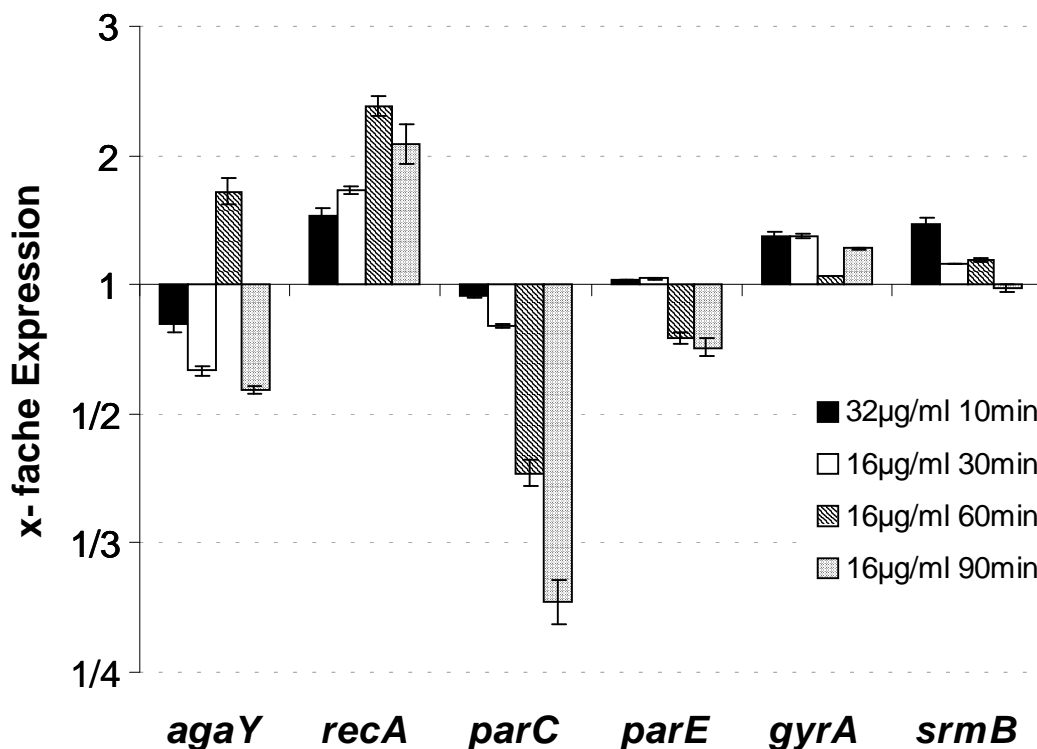


Abbildung 3-19: Änderung der Genexpression in *E. coli* WT nach Zugabe von bakteriostatischen Novobiocinkonzentrationen (16-64 µg/ml) im Vergleich zu unbehandelten Kulturen; Mittelwerte aus 4 unabhängigen Bestimmungen $\pm \Delta Ex_{rel}$

Die Inkubation von WT mit Novobiocin in bakteriostatischen Konzentrationen (siehe 3.1.5) verursachte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zeit- und konzentrationsabhängig eine Zunahme der Expression von *recA* und eine Abnahme der Expression von *parC* und *parE* (Abbildung 3-19). Bereits nach 10minütiger Inkubation konnten signifikant höhere Transkriptmengen von *recA* ($p=0,02$) und *gyrA* ($p=0,01$) festgestellt werden. Nach 30 min zeigte sich neben der erhöhten Transkriptmenge von *recA* (Faktor 1,7; $p=0,001$) und *gyrA* (Faktor 1,4; $p=0,003$) eine signifikante Reduktion des *parC*- (Faktor 0,76; $p=0,001$) und *agaY*-Transkripts (Faktor 0,6; $p=0,005$). Nach 60 min waren die Transkriptmengen von *parC* und *parE* sowohl gegenüber der zeitgleichen Kontrolle als auch gegenüber den Transkriptmengen nach 30 min signifikant ($p<0,003$) reduziert, während sich das *recA*-Transkript signifikant ($p<0,001$) auf das 2,4fache und das *agaY*-Transkript auf das 1,7fache ($p<0,005$) erhöhte. Die Menge des *gyrA*-Transkripts sank hingegen wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle (Faktor 1,1; $p=0,01$). Eine längere Inkubation über 90 min führte zu einer weiteren Abnahme des *parC*-

Transkripts ($p=0,03$) und des *srmB*-Transkripts ($p=0,05$), während die anderen Transkriptmengen unverändert blieben ($p>0,1$). Eine auf 120 min verlängerte Inkubation führte zu keiner weiteren Veränderung der Transkriptmengen (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 3-20 zeigt, dass steigende Novobiocinkonzentrationen im Bereich von 16 $\mu\text{g/ml}$ bis 64 $\mu\text{g/ml}$ nach 60 min eine Zunahme der *recA*-Expression ($p<0,05$) und eine Abnahme der *parE*-Expression ($p<0,1$) verursachten.

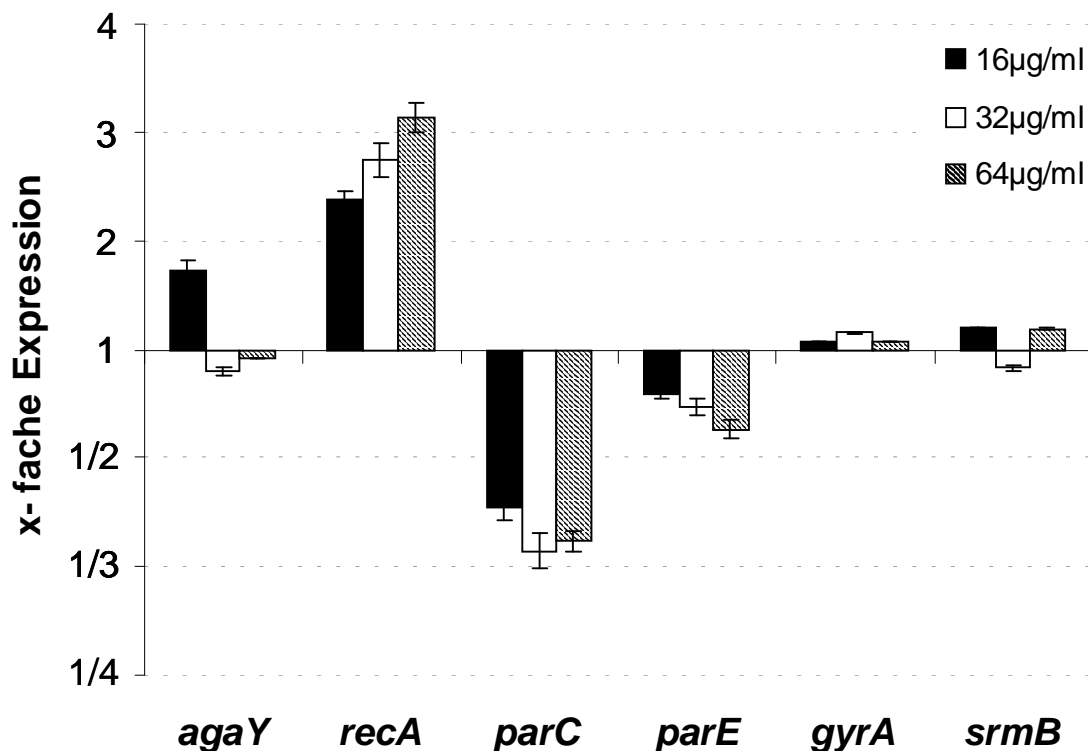


Abbildung 3-20: Änderung der Genexpression in *E. coli* WT 60 min nach Zugabe von bakteriostatischen Novobiocinkonzentrationen (16-64 $\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu unbehandelten Kulturen; Mittelwerte aus 4 unabhängigen Bestimmungen $\pm \Delta E_{x_{rel}}$

Demgegenüber führten die höheren Konzentrationen von 32 $\mu\text{g/ml}$ oder 64 $\mu\text{g/ml}$ nach 60 min zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression von *parE* ($p=0,11$) oder *gyrA* ($p>0,2$).

3.2.6.1.2.2 Effekt durch Kälteschock

Eine Verringerung der Temperatur von 37 °C auf 15 °C bewirkt physikalisch eine Erhöhung des DNA-Twists und dadurch eine Induktion der *recA*-Expression (345). Aufgrund des festgestellten Zusammenhangs zwischen einer Induktion der *recA*- und einer Reduktion der *parC*- und *parE*-Expression nach Novobiocingabe (Abbildung 3-19) sollte ein möglicher Einfluss des DNA-Twists auf die *parC*- und *parE*-Expression verifiziert werden. Hierzu wurde die Expression von *parC* und *parE* nach einem Kälteschock an Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase untersucht. Da die Expression von *gyrA*, durch spezielle Transkriptionsfaktoren einige Stunden nach einem Kälteschock induziert wird (173), diente die Transkription

dieses Gens als Kontrolle für eine Genregulation durch Kälte-induzierte Transkriptionsfaktoren aus der CspA-Familie (94, 348). Die Induktion des Kälteschocks erfolgte durch Überführung der exponentiell wachsenden Bakterienkultur in einen auf 15 °C gekühlten Wasserbadschüttler. Die in Abbildung 3-21 dargestellten Veränderungen der Transkriptmengen nach Induktion eines Kälteschocks repräsentieren lediglich Einzelmessungen und können daher nur tendenzielle Änderungen der jeweiligen Genexpression anzeigen.

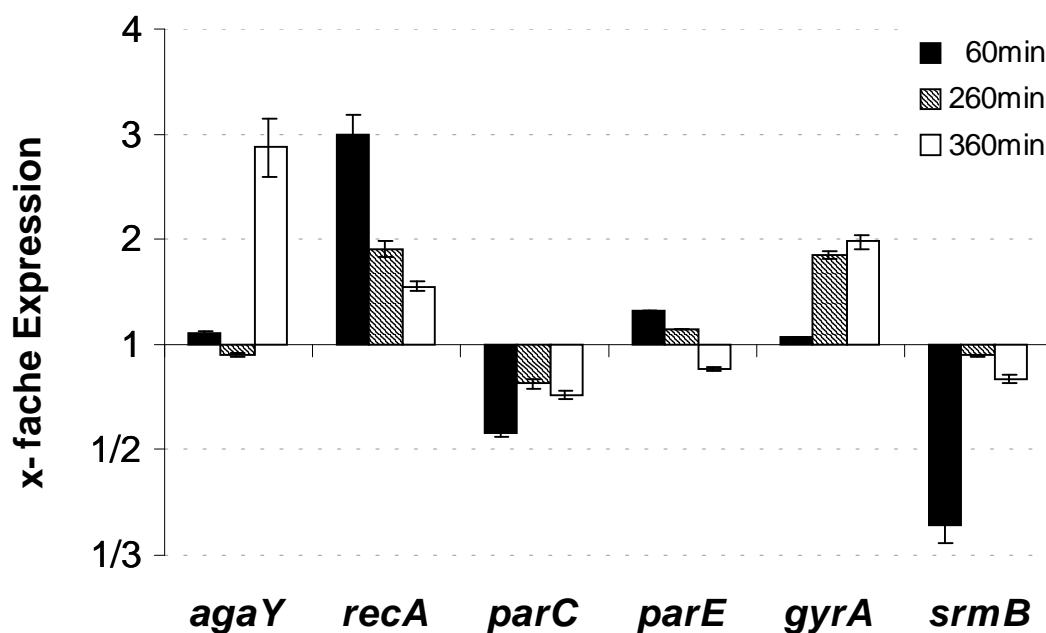


Abbildung 3-21: Änderung der Genexpression in *E. coli* WT in Abhängigkeit eines Kälteschocks (60, 260 und 360 min) im Vergleich zur Expression vor Induktion des Kälteschocks; n = 1; Fehlerbalken repräsentieren die intra-Assay Variation

Der Kälteschock verursachte neben einem sofortigen Stopp des Zellwachstums (keine Zunahme der OD₅₆₀, Daten nicht gezeigt) eine 3fache Induktion der *recA*-Expression nach 60 min, während die Expression von *parC* auf fast die Hälfte und von *srmB* auf fast ein Drittel abfiel. Nach 260 min zeigte von den untersuchten Genen lediglich *gyrA*, die Kontrolle für die Expression später Kälteschockgene, im Vergleich zur unbehandelten Kultur eine auf das 1,8fache gesteigerte Expression. Die Expression von *parC* und *srmB* stieg nach 260 min wieder an, erreichte jedoch nur 70 % (*parC*) bzw. 90 % (*srmB*) der jeweiligen Expression vor dem Kälteschock. Die Induktion der *recA*-Expression reduzierte sich mit anhaltendem Kälteschock auf 190 % nach 260 min bzw. 150 % nach 6 h. Das Referenzgen für Expressionsveränderungen in der stationären Phase, *agaY*, wies erstmals nach 6 h eine um das mehr als 3fache gesteigerte Expression auf.

3.2.6.1.3 Einfluss von Mutationen in *Topo IV* und *Gyrase*

Nachdem ein Einfluss der Mutationen in *parC* und *gyrA* auf die Generationszeit der Stämme WT-4 und WT-3-1 ausgeschlossen wurde (3.1.1.1), sollte untersucht werden, ob diese Mutationen möglicherweise durch Beeinträchtigung der Enzymfunktion zu einer veränderten Genexpression führen. Abbildung 3-22 zeigt die Unterschiede in der Genexpression an exponentiell wachsenden Kulturen von WT-4, WT-3-1, M III und M III-300 im Vergleich zu WT.

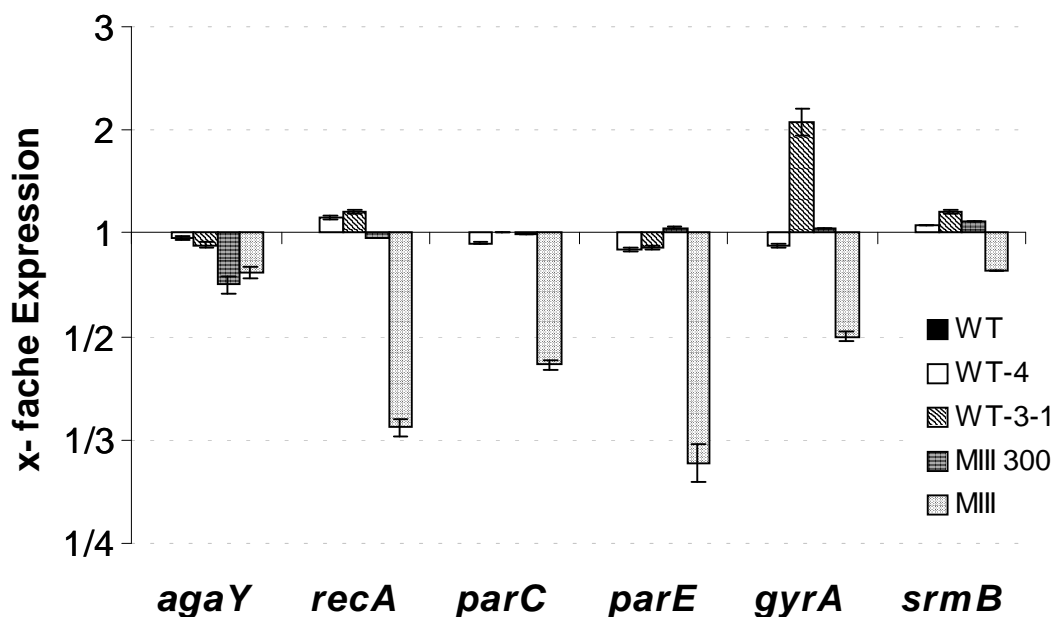


Abbildung 3-22: Änderungen der Genexpression in verschiedenen *E. coli* Mutanten im Vergleich zu WT bei exponentiellem Wachstum ($OD_{560} = 0,6$); Mittelwerte aus 2-3 unabh. Bestimmungen $\pm \Delta Ex_{rel}$

Die *parC*^{S80I} Mutation in WT-4 zeigte keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene. Stamm M III ist gegenüber den WT-Stämmen durch eine verdoppelte Generationszeit charakterisiert (Tab. 3-1) und wies gegenüber WT signifikant reduzierte Transkriptmengen ($p < 0,01$) von *parC*, *parE* und *recA* (jeweils 30–40 %) sowie von *gyrA* und *srmB* (etwa 50 %) auf. Die in ihrer Wachstumsrate gegenüber M III kompensierte Mutante M III-300 besaß hingegen ähnliche Transkriptmengen wie WT. Stamm WT-3-1 wies eine um den Faktor 2,1 erhöhte Expression von *gyrA* ($p = 0,05$) sowie eine leicht erhöhte Expression von *recA* ($p < 0,1$) auf.

Eine Quantifizierung der chromosomalen Kopien von *gyrA* mittels real-time PCR zeigte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen (Daten nicht gezeigt), so dass eine Genduplikation als mögliche Ursache für die erhöhte *gyrA*-Transkription in WT-3-1 ausscheidet. Zur Klärung, ob eine veränderte Promotorstruktur zur erhöhten *gyrA*-Expression in WT-3-1 beiträgt, wurde der nichttranslatierte 5'-Bereich bis 379 bp vor dem Startcodon

sequenziert. Die Sequenzen von WT, WT-4, und MI waren identisch, während in der DNA-Sequenz von WT-3-1 Basenaustausche an Position -139 und -142 möglicherweise eine zusätzliche -10-Binderegion für σ^{70} RNA-Polymerase herstellen, die einen optimalen Abstand (17 bp) zu einer möglichen -35 Region aufweist (Abbildung 3-23).

	-200	-190	-180	-170	-160	
WT-3-1	CAAGATCCCA	CCAGCGGGAG	GCGAC AGCTT	CAAATTTAGC	GATCTCTTCG	
WT, WT-4, MI	CAAGATCCCA	CCAGCGGGAG	GCGACGGCTT	CAAATTTAGC	GATCTCTTCG	
K12	CCAGATCCCA	CCAGCGGGAG	GCGACGGCTT	CAAATTTAGC	GATCTCTTCG	
				-35 Region		
	-150	-140	-130	-120	-110	
WT-3-1	TGGTCTA	CAT TAT	GGTTTAC	CGGCGATTTT	TCGGCATTCA	TTGGCACTTC
WT, WT-4, MI	TGGTCTACGT	TGTGGTTTAC	CGGCGATTTT	TCGGCATTCA	TTGGCACTTC	
K12	TGGTCTACGT	TATGGTTTAC	CGGCGATTTT	TCGGCATTCA	TTGGCACTTC	
		-10 Region				
	-100	-90	-80	-70	-60	
WT-3-1	TACTCCGTAA	TTGGCAAGAC	AAACGAGTAT	ATCAGGCATT	GGATGTGAAT	
WT, WT-4, MI	TACTCCGTAA	TTGGCAAGAC	AAACGAGTAT	ATCAGGCATT	GGATGTGAAT	
K12	TACTCCGTAA	TTGGCAAGAC	AAACGAGTAT	ATCAGGCATT	GGATGTGAAT	
	-50	-40	-30	-20	-10	
WT-3-1	AAAGCGTATA	GGTTTACC	TC AAAC	TGCGCG	GCTGTGTTAT	AATTTGCGAC
WT, WT-4, MI	AAAGCGTATA	GGTTTACC	TC AAAC	TGCGCG	GCTGTGTTAT	AATTTGCGAC
K12	AAAGCGTATA	GGTTTACC	TC AAAC	TGCGCG	GCTGTGTTAT	AATTTGCGAC
		-35 Region			-10 Region	
	1	10	20	30		
WT-3-1	CTTTGAATCC	GGGATACAGT	AGAGGGATAG	CGGTTAG ATG		
WT, WT-4, MI	CTTTGAATCC	GGGATACAGT	AGAGGGATAG	CGGTTAG ATG		
K12	CTTTGAATCC	GGGATACAGT	AGAGGGATAG	CGGTTAG ATG		

Abbildung 3-23: Alignment der *gyrA*-Sequenzen von WT-3-1, WT, WT-4, MI und *E. coli* K12; Transkriptionsstart (+1) sowie -10 und -35 Regionen nach (230); fettgedruckte Basen: abweichend zu WT, WT-4 und MI; Boxen: mögliche -10 und -35 Regionen.

3.2.6.2 Expression des SOS-Gens *recA*

Zellmorphologische Analysen (3.1.2.1) an exponentiell wachsenden Kulturen von WT-4 und WT-3-1 zeigten nach einer Hemmung durch Ciprofloxacin und Norfloxacin eine Filamentierung als Zeichen einer Induktion der SOS-Antwort, (Abbildung 3-2). Durch die Bestimmung der Transkriptmengen des SOS-Gens *recA* sollte eine solche Induktion infolge der Hemmung von Gyrase oder Topo IV verifiziert und quantifiziert werden.

3.2.6.2.1 Induktion durch Ciprofloxacin

Ciprofloxacin bewirkte durch Hemmung von Gyrase in WT eine konzentrations- und zeitabhängige Induktion der *recA*-Expression. Nach 30 min (Daten nicht gezeigt) führten subinhibitorische Konzentrationen von 1/4 x MHK (0,004 µg/ml) zu einem 2fachen Anstieg. Höhere Konzentrationen bewirkten eine entsprechend stärkere Induktion (Faktor 3,3 bei MHK und Faktor 8,1 bei 8 x MHK) der *recA*-Expression. Nach 60 min (Abbildung 3-24) konnte ebenfalls eine Zunahme ($p < 0,006$) des *recA*-Transkripts ab einer Konzentration von 0,004 µg/ml festgestellt werden. Die Erhöhung der Konzentration von 0,002 µg/ml auf 0,008 µg/ml bzw. von 0,008 µg/ml auf 0,016 µg/ml verursachte jeweils eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) des *recA*-Transkripts bis zum 4,7-5,7fachen bei 0,016 µg/ml (Abbildung 3-24 und 3-25). Unter der 8fachen MHK (0,1 µg/ml) war hingegen die Menge aller untersuchten Transkripte stark reduziert ($p < 0,01$).

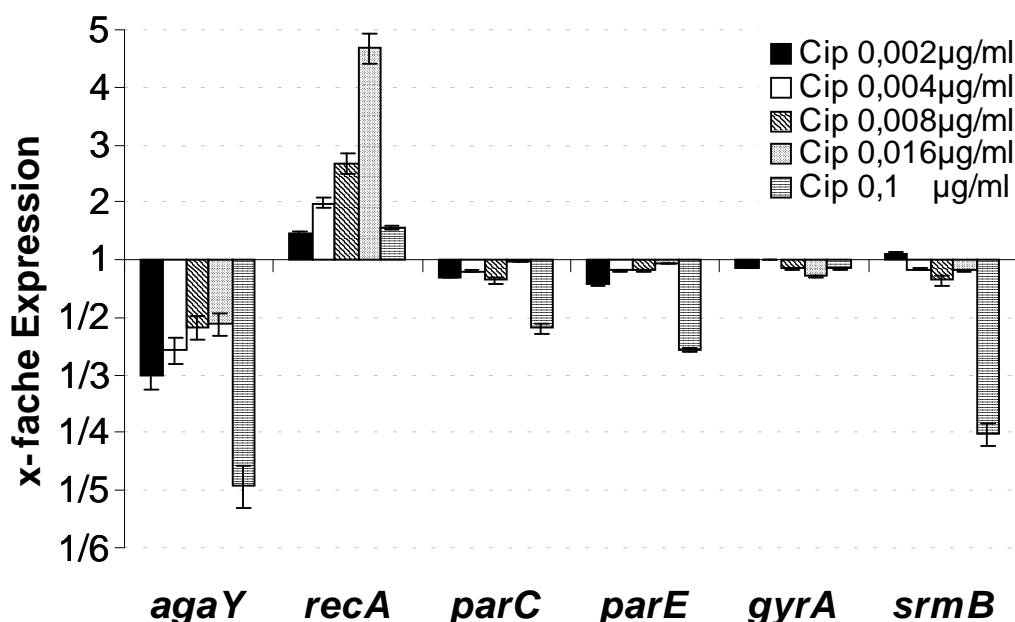


Abbildung 3-24: Änderungen der Genexpression in *E. coli* WT nach 1 h Inkubation mit subinhibitorischen und bakterio-statischen Ciprofloxacin-konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; Mittelwerte aus 3 unabh. Bestimmungen $\pm \Delta Ex_{rel}$

Über den Zeitraum von 3 h zeigte sich unter einer bakterio-statischen Ciprofloxacin-konzentration zusätzlich eine zeitabhängige Veränderung der *recA*-Transkriptmenge (Abbildung 3-25). Nach einem Anstieg auf das 4fache nach 15 min ($p < 0,0001$) und einem weiteren Anstieg auf das 5,7fache nach 60 min ($p < 0,0001$) sank die Transkriptmenge nach 2 h wieder auf das 3,8fache ab ($p = 0,0006$). Diese Abnahme war gleichzeitig verbunden mit einer signifikanten Reduktion ($p < 0,017$) aller untersuchten Transkripte mit Ausnahme des *gyrA*-Transkripts, das wieder zunahm ($p = 0,0007$). Nach einer dreistündigen Inkubation stieg die Menge des *recA*-Transkripts auf das 7fache an ($p < 0,01$).

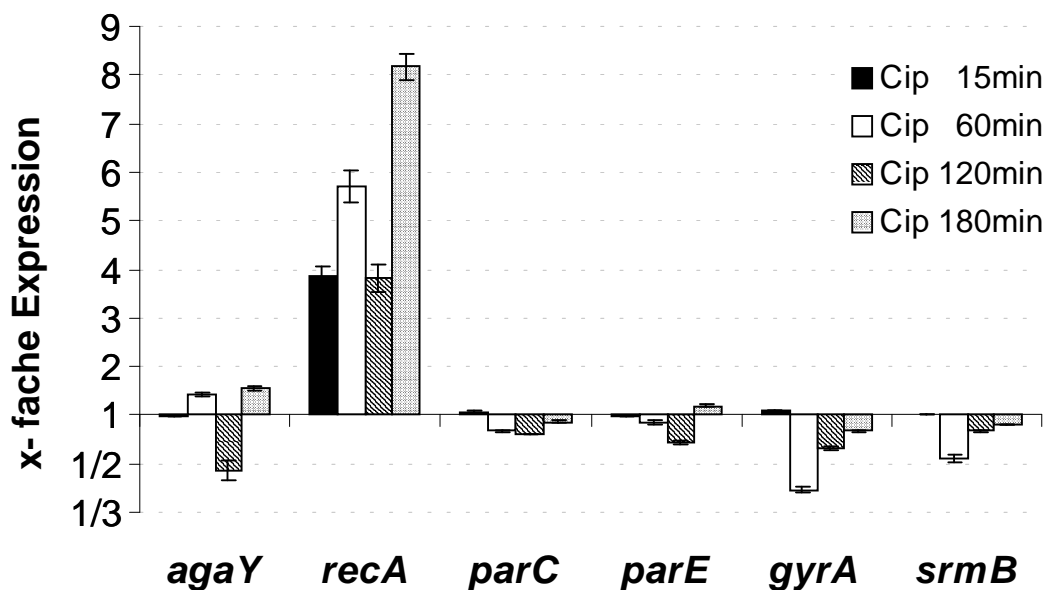


Abbildung 3-25: Änderungen der Genexpression in *E. coli* WT nach Inkubation mit einer bakteriostatischen Ciprofloxacinkonzentration (0,016 $\mu\text{g/ml}$) über 180 min im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle; Mittelwerte aus 3-6 unabh. Bestimmungen $\pm \Delta\text{Ex}_{\text{rel}}$

Die Auswirkungen einer Hemmung von Topo IV durch Ciprofloxacin auf die Genexpression wurden nur durch eine Einzelmessung erfasst, so dass die Ergebnisse nur eine Tendenz wiedergeben. Bakteriostatische Ciprofloxacinkonzentration (0,56 $\mu\text{g/ml}$) führten nach Hemmung von Topo IV zu einem ähnlichen Induktionsprofil von *recA*, jedoch mit Induktionsfaktoren, die um 30-50 % niedriger lagen als nach der Hemmung von Gyrase. Die Hemmung von Topo IV führte anders als die Hemmung von Gyrase nach 180 min zu einem starken Rückgang der *parC*-Transkriptmenge auf <30 % (Abbildung 3-26).

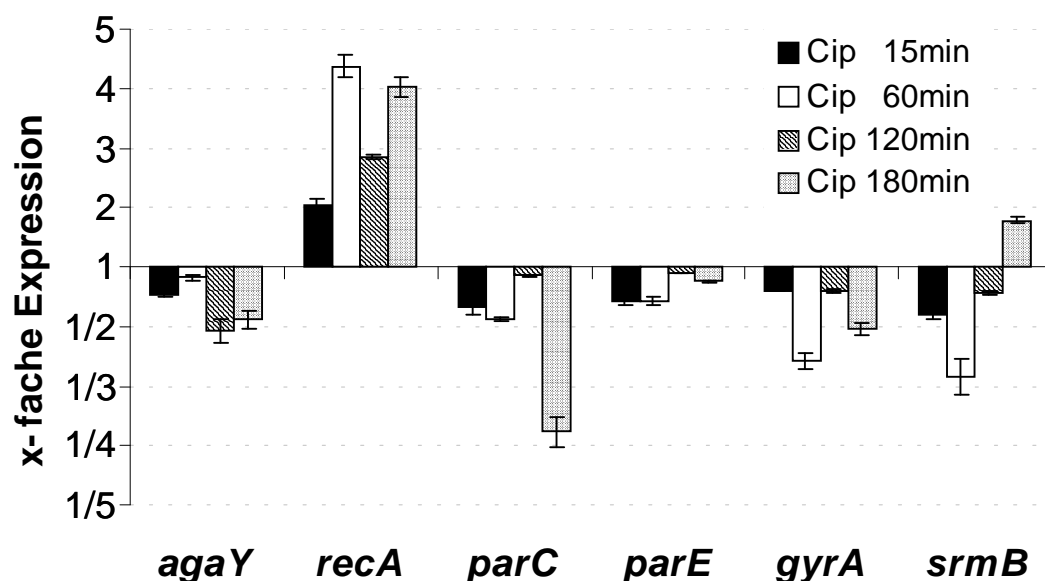


Abbildung 3-26: Änderungen der Genexpression in *E. coli* WT-3-1 nach Inkubation mit einer bakteriostatischen Ciprofloxacinkonzentration (0,56 $\mu\text{g/ml}$) über 180 min im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle; n = 1; Fehlerbalken repräsentieren die intra-Assay Variation

3.2.6.2.2 Induktion durch Norfloxacin

Die ermittelten Expressionsänderungen von *recA* nach einer Hemmung von Gyrase (Abb. 3-27) und Topo IV (Abb. 3-28) durch bakteriostatische Norfloxacin-Konzentrationen entstammen einer Einzelmessung und stellen daher nur tendenzielle Ergebnisse dar.

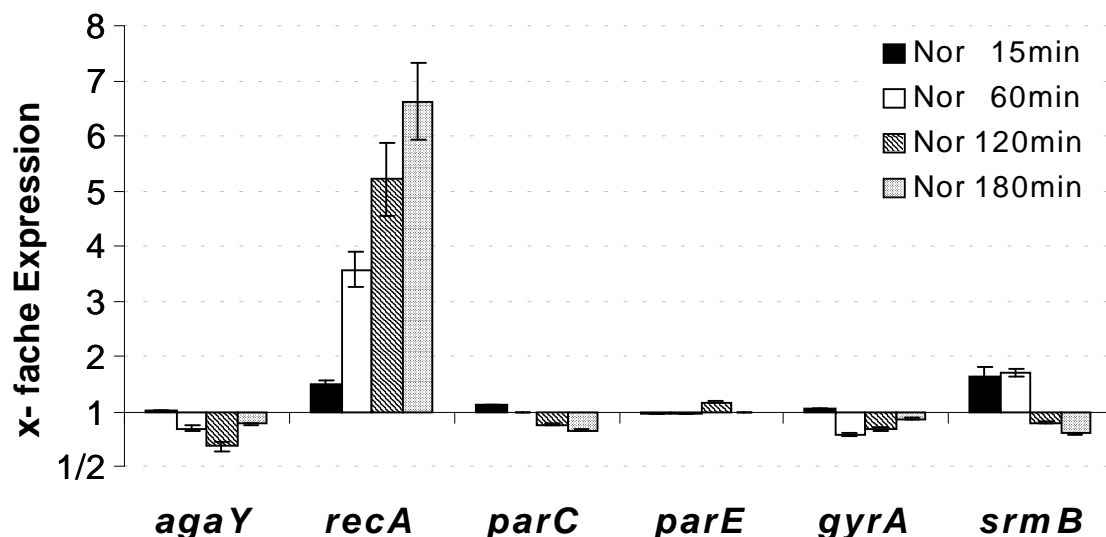


Abbildung 3-27: Änderungen der Genexpression in *E. coli* WT nach Inkubation mit einer bakteriostatischen Norfloxacin-Konzentration (0,07 µg/ml) über 180 min im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle; n = 1; Fehlerbalken repräsentieren die intra-Assay Variation

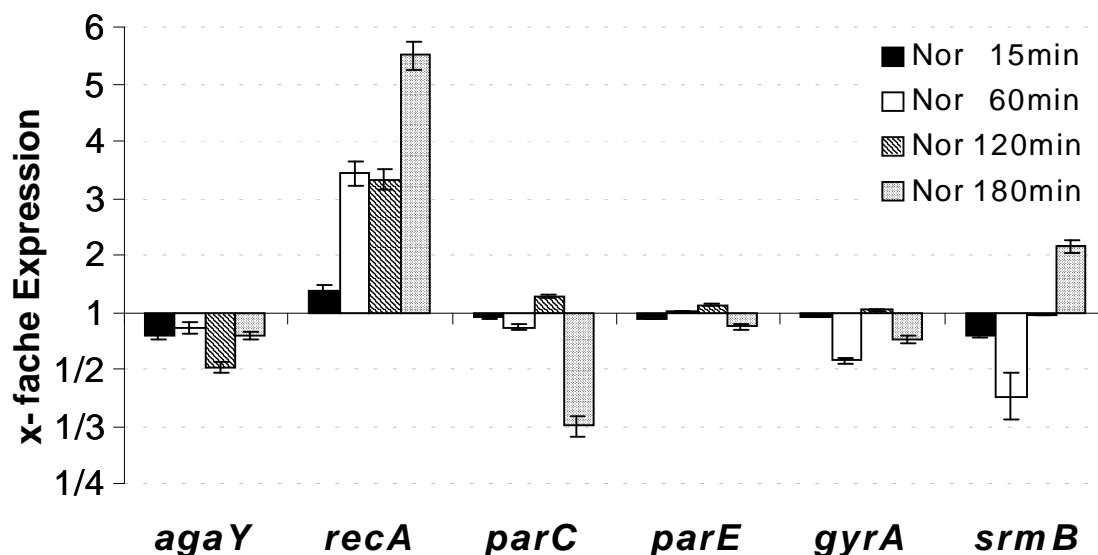


Abbildung 3-28: Änderungen der Genexpression in *E. coli* WT-3-1 nach Inkubation mit einer bakteriostatischen Norfloxacin-Konzentration (1,0 µg/ml) über 180 min gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle; n = 1; Fehlerbalken repräsentieren die intra-Assay Variation

Die Hemmung von Gyrase und Topo IV durch Norfloxacin verursachte eine mit der Inkubationszeit zunehmende Induktion der *recA*-Expression. Die Induktionsfaktoren, die durch Hemmung von Gyrase nach 15 min bzw. 1 h auftraten, wurden auch durch Hemmung von

Topo IV erzielt und entsprachen etwa den Induktionsfaktoren, die durch Hemmung von Topo IV mit Ciprofloxacin (Abb. 3-26) erzielt wurden. Anders verhielt es sich nach einer längeren Inkubation. Nach 2 h und 3 h verursachte Norfloxacin durch Hemmung von Gyrase eine 1,5fach stärkere Induktion als durch Hemmung von Topo IV (vergl. Abbildung 3-27 und 28). Zusätzlich unterschieden sich nach dieser längeren Inkubation Norfloxacin und Ciprofloxacin bezüglich der nach Hemmung von Gyrase und Topo IV verursachten *recA*-Induktion. Die 2stündige Hemmung von Gyrase durch Ciprofloxacin (Abb. 3-25) verursachte eine etwa 3fache Induktion, die entsprechende Hemmung durch Norfloxacin (Abb. 3-27) hingegen eine 5,5fache Induktion, entsprechend dem unter Ciprofloxacin beobachteten Rückgang der *recA*-Induktion im Vergleich zum 1 h-Wert und der über 3 h kontinuierlich zunehmenden Induktion durch Norfloxacin. Nach einer 3stündigen Hemmung von Gyrase wurde hingegen durch Ciprofloxacin (Abb. 3-25) eine etwas stärkere *recA*-Induktion verursacht als durch Norfloxacin (Abb. 3-27; Faktor 8,1 vs. 6,6), nach Hemmung von Topo IV jedoch eine stärkere Induktion durch Norfloxacin (Faktor 5,5; Abb. 3-28) als durch Ciprofloxacin (Faktor 4,0; Abb. 3-26).

Die Hemmung von Topo IV durch Norfloxacin (Abb. 3-28) führte wie bereits für Ciprofloxacin gezeigt (Abb. 3-26) nach 3 h zu einem starken Rückgang der *parC*-Transkriptmenge auf 30 %. Die entsprechende Hemmung von Gyrase führte hingegen zu keinem Rückgang der *parC*-Expression.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expression von *parC* und *parE*, der beiden Strukturgene von Topo IV, durch einen verringerten DNA-Überspiralisierungsgrad negativ beeinflusst wird und bei exponentiellem Wachstum im Vergleich zu teilungsinaktiven Zellen ein Vielfaches der jeweiligen Transkriptmengen vorliegt (3.2.6.1.1). Diese höheren Transkriptmengen korrelieren mit der gegenüber Ciprofloxacin höheren Empfindlichkeit von Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 3-6). An der vom Überspiralisierungsgrad abhängigen Regulation der *parC*- und *parE*-Expression sind neben σ^{70} -abhängigen Promotoren, die über die Transkriptionsstartpunkte in Verbindung mit Sequenzhomologien identifiziert wurden, möglicherweise auch DNA-Bindeproteine wie CRP und H-NS beteiligt. Die Hemmung von Topo IV durch die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin zeigte unter den getesteten Bedingungen weniger Zellschäden, eine geringere Induktion von *recA* und einen negativen Einfluss auf die Expression von *parC* als die entsprechende Hemmung von Gyrase (Tab. 3-5, Abb. 3-4, 3-24 bis 3-28). Ciprofloxacin und Norfloxacin unterschieden sich zudem in ihrer Wirkung, indem Ciprofloxacin nach Hemmung von Gyrase oder Topo IV eine stärkere zytotoxische Wirkung und ein anderes Induktionsprofil der *recA*-Expression verursachte als Norfloxacin (Abb. 3-24 bis 3-28).

4 Diskussion

Topoisomerasen sind für alle Zellen essentiell, da sie die räumliche Struktur der DNA regulieren. Zellen benötigen eine unterwundene DNA, die zur Verbiegung der DNA-Helixachse und zur Ausbildung einer sogenannten negativen Überspiralisierung führt, um die DNA-Strangtrennung für Vorgänge wie Replikation, Trennung von Tochterchromosomen, Rekombination und Transkription zu erleichtern. Aufgrund der doppelhelikalen Struktur der DNA verursachen diese Prozesse der vorübergehenden DNA-Strangtrennung Torsionsspannungen, die von Topoisomerasen aufgelöst werden müssen, indem diese temporäre Einzel- oder Doppelstrangbrüche der DNA katalysieren (179, 190). Unter den Topoisomerasen in *E. coli* besitzt Topoisomerase IV (Topo IV) die umfangreichste Funktion: Topo IV ist ein Heterotetramer, bestehend aus je zwei A- und B-Unterheiten (A_2B_2), die durch die korrespondierenden Gene *parC* und *parE* codiert werden. Das Enzym katalysiert die Trennung der Tochterchromosomen nach der Replikation (272, 365) und die Relaxierung von positiv und negativ überspiralisierter DNA, die während der Replikation und Transkription entsteht (71, 365). Funktionell weist Topo IV damit eine hohe Homologie zu eukaryontischen Typ II Topoisomerase-Enzymen auf.

Die beiden bakteriellen Typ II Topoisomerasen, Gyrase und Topo IV, sind die Zielstrukturen für die klinisch bedeutsamen Fluorchinolon-Antibiotika, von denen einige auch eine Wirkung auf eukaryontische Topoisomerase II ausüben (4). Topo IV besitzt in gramnegativen Bakterien wie *E. coli* eine geringere natürliche Empfindlichkeit für Fluorchinolone als Gyrase und fungiert daher nur als sekundäre Zielstruktur (135, 184, 290). Zur Resistenz gegenüber dieser Substanzgruppe führen daher nur Mutationen in Gyrase, der empfindlicheren primären Zielstruktur, wie Daten von Labormutanten und klinischen Isolaten gramnegativer Bakterien zeigen (135, 184). Aufgrund der zunehmenden Anzahl klinischer Isolate mit resistenter Gyrase kommt der Hemmung von Topo IV eine immer größere Bedeutung zu. Da in solchen Gyrase-Mutanten (z. B. WT-3-1) nunmehr Topo IV die empfindlichere Zielstruktur für Fluorchinolone ist, eignen sich diese Mutanten besonders für Untersuchungen zu den durch selektive Topo IV-Hemmung ausgelösten bakteriziden Mechanismen.

Die Wirksamkeit von Fluorchinolonen ist nicht nur abhängig von ihrer Affinität zu den A-Untereinheiten (GyrA und ParC) der beiden Zielstrukturen (Gyrase und Topo IV) und der intrazellulären Inhibitorkonzentration, sondern auch von dem physiologischen Zustand der Bakterienzelle. So erhöht sich die Wirkung dieser Inhibitoren mit zunehmender Wachstumsrate (75, 84, 86, 111), zunehmender Anzahl an Zielstrukturen (Typ II Topoisomerasen) und deren Schnittstellen im Bakterienchromosom (60, 150, 184, 355) und einer verringerten Fähigkeit zur

Rekombination und Reparatur von DNA-Schäden (101, 182).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Untersuchung der Genexpression von *parC* und *parE* sowie der zellulären Folgen einer gezielten Hemmung von Topo IV in der Mutante WT-3-1 unter verschiedenen zellphysiologischen Bedingungen, den bisherigen Erkenntnisstand über die zelluläre Funktion dieses Enzyms in *E. coli* und dessen Bedeutung für die Wirkungsweise von Fluorchinolonen und anderen Topoisomerase-Inhibitoren zu erweitern.

4.1 Fluorchinolonwirkung auf teilungsaktive und teilungsinaktive Zellen

Fluorchinolone und andere Verbindungen wie Flavone und Epipodophyllotoxine wirken als irreversible Inhibitoren und werden auch als „topoisomerase poisons“ (107) bezeichnet. Sie stabilisieren ein Intermediat im Reaktionszyklus des Enzyms, in dem die DNA geschnitten und mit ihrem 5'-Phosphat über ein Tyrosinrest kovalent an das Enzym gebunden ist (58, 107). Auf diese Weise entstehen ternäre Komplexe aus Inhibitor, Topoisomerase und geschnittener DNA, die eine lange Halbwertszeit besitzen (291) und durch noch nicht genau verstandenen Prozesse in schwer reparierbare, zytotoxische DNA-Doppelstrangbrüche überführt werden können (85, 111, 113, 143, 190, 354). Solche zytotoxischen DNA-Doppelstrangbrüche werden allerdings auch durch bestimmte Gyrase-Mutationen (z. B. *gyrA208*) (110) oder 5,6-Dioxinochinolone (213) induziert, ohne dabei ternäre Komplexe zu stabilisieren. Es wird daher postuliert, dass bei uneingeschränktem Zellwachstum jeder Stopp der Replikation, z. B. durch eine gehemmte oder funktionell eingeschränkte Gyrase, einen Zusammenbruch der Replikationsgabel, die Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen, die Induktion der SOS-Antwort und Zelltod zur Folge hat (111, 354).

Untersuchungen von Khodursky et al. zeigten erstmals, dass je nach Hemmung von Gyrase oder Topo IV Unterschiede in der Wirkung des Fluorchinolons Norfloxacin auf exponentiell wachsende *E. coli*-Kulturen auftreten. Während die Hemmung von Gyrase eine rasche Reduktion der DNA-Synthese und einen schnellen Verlust der Zellteilungsfähigkeit bewirkte, verursachte die Hemmung von Topo IV nur einen langsamen Stopp der DNA-Synthese und nahezu keinen Verlust der Fähigkeit zur Koloniebildung über mehrere Stunden (182-184). Da die Anzahl und das Muster der Topoisomerase-Schnittstellen durch die Struktur des Inhibitors beeinflusst wird (5, 203, 259, 319) und mit der zytotoxischen Wirkung korreliert (247), stellte sich die Frage, ob andere Fluorchinolone wie Ciprofloxacin und Moxifloxacin mit einer höheren Affinität zu Gyrase und Topo IV (290) eine stärkere zytotoxische Wirkung nach Hemmung dieser beiden Zielstrukturen verursachen und welche Rolle hierbei dem Zellwachstum zukommt.

Die zytotoxische Wirkung von Fluorchinolonen mit unterschiedlicher Affinität zu den beiden Zielstrukturen wurde daher anhand von Absterbekinetiken, Veränderungen der Zellmorphologie und Induktion der SOS-Antwort an Stämmen untersucht, die eine selektive Hemmung von

Gyrase (WT-4) oder Topo IV (WT-3-1) ermöglichten. Um zudem den Einfluss der Zellphysiologie auf die Fluorchinolonwirkung aufzuzeigen, wurden für diese Untersuchungen teilungsaktive Zellen sowie teilungsinaktive Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen einer Batchkultur verwendet.

Die Ergebnisse aus Tab. 3-5 sowie den Abb. 3-1, 3-2 und 3-3 zeigen zusammen, dass teilungsaktive Zellen aus exponentiell wachsenden Kulturen durch die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin in Abhängigkeit des verwendeten Nährmediums und der gehemmten Zielstruktur unterschiedlich stark geschädigt werden. Ein Einfluss des Nährmediums zeigte sich durch den in LB-Medium im Vergleich zu NI-Medium 15-50fach geringeren Verlust der Zellteilungsfähigkeit nach Hemmung von Gyrase und Topo IV durch Ciprofloxacin und von Gyrase durch Norfloxacin (Tab. 3-5). Die gemessene Keimzahlreduktion nach Hemmung von Topo IV durch Norfloxacin wurde hingegen nicht durch das Nährmedium beeinflusst (Tab. 3-5). Weitere Absterbekinetiken in NI-Medium, die von Körber et al. (188) durchgeführt wurden, zeigen einen annähernd identischen Verlust der Zellteilungsfähigkeit ($-4\log_{10}$ nach 3 h) nach Hemmung von Gyrase (WT-4) und Topo IV (WT-3-1) durch Ciprofloxacin und Moxifloxacin und bestätigen damit die Ergebnisse aus Tab. 3-5.

Die Ursachen für die in LB-Medium geringere zytotoxische Wirkung von Norfloxacin auf Gyrase und von Ciprofloxacin auf beide Zielstrukturen (Tab. 3-5) sowie für die geringere Empfindlichkeit gegenüber Novobiocin (3.1.5) sind nicht bekannt.

Die Empfindlichkeit gegenüber Norfloxacin, Ciprofloxacin und Novobiocin wird allerdings unterschiedlich stark durch den pH-Wert und die Konzentration von Kationen im Nährmedium beeinflusst (41, 177, 311). So reduzieren beispielsweise erhöhte Magnesiumkonzentrationen die Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen (62, 196, 244) und gegenüber Novobiocin (44) um den Faktor 2 bis 16. Da die beiden verwendeten Nährmedien (LB- und NI-Bouillon) jedoch den gleichen pH-Wert (7,2) besaßen und vermutlich auch annähernd gleiche Kationenkonzentrationen, müssen andere Faktoren für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten in den beiden Nährmedien verantwortlich sein.

Einer dieser Faktoren könnte der Glucosegehalt sein. Während in NI-Medium 1 % Glucose bzw. in MH-Medium 1,5 % Stärke enthalten ist, fehlt Glucose in LB-Medium. Die daher in LB-Medium vorliegenden hohen zellulären cAMP-Spiegel führen zur Aktivierung zahlreicher Promotoren durch das cAMP Receptor Protein (CRP) (330), darunter auch der Promotor von *gyrA* (118). Ursächlich für diese Aktivierung ist vermutlich eine Veränderung des lokalen DNA-Überspiralisierungswerts infolge der Bindung von CRP an DNA-Sequenzen im Promotorbereich (186). Der Zusatz von 1 % Glucose zu LB-Medium verhindert die Induktion des SOS-Gens *yebG* infolge von DNA-Schäden (254). Die Induktion des SOS-Regulons durch DNA-Schäden, die während der stationären Phase entstehen, erfolgt ebenfalls nur bei hohen cAMP-

Spiegeln (169, 322). Eine stärkere *gyrA*- und damit vermutlich Gyrase-Expression in LB-Medium würde zwar eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Novobiocin erklären (76, 166), andererseits aber zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen (182, 355) führen. Eine stärkere Induktion des SOS-Regulons, infolge höherer zellulärer cAMP-Spiegel, könnte jedoch zu einer effizienteren Reparatur von DNA-Schäden führen, die durch Hemmung von Gyrase und Topo IV entstehen, und damit die verminderte Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Fluorchinolonen und Novobiocin erklären. Die vom Nährmedium unabhängige jedoch geringe zytotoxische Wirkung von Norfloxacin nach Hemmung von Topo IV (Tab. 3-5) könnte auf die relativ geringe Stabilität der gebildeten spezifischen ternären Komplexe (290) zurückgeführt werden. Für die Reparatur der resultierenden geringeren Anzahl an DNA-Schäden, bringt möglicherweise eine in LB-Medium stärker induzierte SOS-Antwort keinen Vorteil.

Die in N I-Medium festgestellte geringere zytotoxische Wirkung von Ciprofloxacin und vor allem von Norfloxacin nach Hemmung von Topo IV im Vergleich zur Hemmung von Gyrase (Tab. 3-5) ähnelt den Daten anderer Arbeitsgruppen (72, 184). Khodursky et al. postulierten, dass die geringere Zytotoxizität nach Hemmung von Topo IV durch Norfloxacin aus der Lokalisierung von Topo IV hinter der Replikationsgabel resultiert. Der Zelle würde somit mehr Zeit für eine Reparatur verbleiben, bis eine voranschreitende Replikationsgabel auf einen ternären Topo IV-Komplex trifft und einen DNA-Doppelstrangbruch induziert (182, 184). Diese Lokalisierung wurde mittlerweile durch eine nachgewiesene Interaktion von Topo IV mit FtsK und SeqA (93, 176) bestätigt. Eine weitere Erklärung für die geringere zytotoxische Wirkung von Ciprofloxacin und Norfloxacin nach Hemmung von Topo IV bieten Studien, die für Topo IV weniger Ciprofloxacin- und Norfloxacin-induzierte Schnittstellen im Chromosom nachgewiesen haben als für Gyrase (60, 150). Neuere Untersuchungen implizieren zudem, dass DNA-Schäden, die durch ternäre Norfloxacin-Topo IV-Komplexe entstehen, durch andere und effizientere Mechanismen repariert werden als solche, die durch ternäre Norfloxacin-Gyrase-Komplexe entstehen (304).

Die im Vergleich zu Norfloxacin wesentlich stärkere zytotoxische Wirkung von Ciprofloxacin und Moxifloxacin nach Hemmung von Topo IV in N I-Medium (Tab. 3-5, [188]) lässt sich mit einer höheren Stabilität der gebildeten ternären Komplexe (290) erklären. Strumberg et al. konnte zudem an isolierter Gyrase zeigen, dass Ciprofloxacin andere Schnittstellen induziert als Norfloxacin und die DNA-Sequenz der Schnittstelle offenbar die Stabilität eines ternären Komplexes beeinflusst (318). Entsprechende Unterschiede in der Stabilität sind demnach auch für ternäre Topo IV-Komplexe denkbar. Die Fluorchinolon-spezifischen Komplexstabilitäten (290, 318) erklären auch die unterschiedliche zytotoxische Wirkung auf teilungsinaktive Zellen (s. u.).

Da eine höhere Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen zu einer stärkeren Induktion der SOS-Antwort führt (11, 295, 337), wurde untersucht, inwieweit die gemessenen Unterschiede in der Zytotoxizität verschiedener Fluorchinolone nach Hemmung von Gyrase oder Topo IV mit einer veränderten Induktion des SOS-Gens *recA* bzw. einem veränderten Filamentierungsgrad innerhalb der Kultur einhergehen.

Die Induktion der SOS-Antwort durch Chinolone resultiert aus der Prozessierung von DNA-Doppelstrangbrüchen, die vermutlich durch Kollision von replikativen Helicasen oder RNA-Polymerasen mit ternären Gyrase- oder Topo IV-Komplexen entstehen (143, 303, 354). Bereits bei ungestörtem exponentiellen Wachstum unter aeroben Bedingungen treten in jeder Generation etwa 3.000-5.000 oxidationsbedingte DNA-Läsionen auf. Diese führen meist zu einem Abbruch der Replikationsgabel und teilweise zu temporären DNA-Doppelstrangbrüchen, die jedoch offenbar erfolgreich repariert werden können (70). Erhöht sich die Anzahl der DNA-Schäden beispielsweise durch die Wirkung von Chinolonen, oder durch eine in ihrer Funktion eingeschränkte Gyrase (110, 111), kommt es zu einer verstärkten Induktion der SOS-Antwort, zur Filamentierung der Zellen und zu Zellysis (91). Aber selbst bei ausbleibender Lysis sind filamentierte Zellen durch Chinolone vermutlich so stark geschädigt, dass eine normale Zellteilung auch nach Entfernen des Chinolons nicht mehr stattfindet (352). Fluorchinolone mit einer hohen Affinität zu Gyrase (z. B. Ciprofloxacin und Moxifloxacin) führen in exponentiell wachsenden Kulturen möglicherweise zu mehr DNA-Doppelstrangbrüchen und daher zum beobachteten stärkeren Verlust der Teilungsfähigkeit (Tab. 3-5, [188]) als Fluorchinolone mit geringerer Affinität (z. B. Norfloxacin).

Untersuchungen von Elliot et al. zeigten, dass trotz unterschiedlicher Affinität von Ciprofloxacin und Norfloxacin, beide Fluorchinolone nach Hemmung von Gyrase die gleichen zellmorphologischen Veränderungen wie Filamentierung, Ausbildung von Vakuolen und Zellysis verursachten (91). Die vorliegende Arbeit zeigte hingegen, dass diese zellmorphologischen Veränderungen in Abhängigkeit von der gehemmten Zielstruktur unterschiedlich stark ausfielen. Im Vergleich zur Hemmung von Topo IV führte die Hemmung von Gyrase durch Ciprofloxacin innerhalb der ersten 3 h zu einer geringeren Filamentierung und einem höheren Anteil an lysierten Zellen (Abb. 3-3) und deutet daher auf eine stärkere DNA- und Zellschädigung, entsprechend dem beobachteten stärkeren Verlust der Teilungsfähigkeit (Tab. 3-5, [188]). Andere Studien zeigten, dass das Ausmaß der morphologischen Veränderungen auch von der Chinolonkonzentration abhängt. Hohe Chinolonkonzentrationen (10 x MHK) verursachten häufiger eine Zellysis, einen geringeren Filamentierungsgrad und eine stärkere Induktion der SOS-Antwort als Konzentrationen nahe der MHK (91, 268, 269).

Unter Norfloxacin nimmt der Anteil filamentierter Zellen mit steigender Inkubationszeit – möglicherweise aufgrund zunehmender Zellysis – ab (91). Dieses Phänomen war auch unter

Einwirkung von Ciprofloxacin zu beobachten (Abb. 3-3) und erklärt möglicherweise den geringen und von der gehemmten Zielstruktur oder dem eingesetzten Fluorchinolon unabhängigen Filamentierungsgrad nach einer längeren, vierstündigen Inkubation (Abb. 3-2).

Für eine differenziertere Analyse der Induktion des SOS-Regulons nach Hemmung von Gyrase und Topo IV durch bakteriostatische Konzentrationen verschiedener Fluorchinolone wurde die *recA*-Expression mittels real-time RT-PCR gemessen (3.2.6.2). Bereits subinhibitorische Ciprofloxacinkonzentrationen führten nach Hemmung von Gyrase zu einer erhöhten Expression von *recA* (Abb. 3-24), entsprechend den Expressionsdaten anderer Arbeitsgruppen (270, 363). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bereits subinhibitorische Ciprofloxacinkonzentrationen zur Bildung von ternären Gyrase-Komplexen und DNA-Schäden führen, die aber entweder repariert werden können, oder nur in wenigen Zellen der Kultur auftreten und daher das Wachstum der Kultur nur unwesentlich beeinträchtigen. Ternäre Gyrase-Komplexe bildeten sich auch mit subinhibitorischen Nalidixinsäurekonzentrationen (111), und subinhibitorische Norfloxacin-Konzentration führen offenbar ebenfalls zu DNA-Schäden, wie die RecA-vermittelte Induktion der Prophagen VT1 und VT2 in enterohämorrhagischen *E. coli* zeigt (221). Die Zunahme des *recA*-Transkripts aufgrund bakteriostatischer Ciprofloxacinkonzentrationen (Abb. 3-24 bis 3-26) entspricht Messungen aus Promotorfusionen, die sowohl nach UV-Bestrahlung als auch nach Zusatz von Ciprofloxacin eine 6fache Induktion der *recA*-Expression nach 2 h zeigten (331). Die Abhängigkeit der *recA*-Expression von der Chinolonkonzentration (270, 363) wurde durch die Ergebnisse aus Abb. 3-24 bestätigt, wonach die stärkste *recA*-Expression nach 30minütiger Hemmung von Gyrase durch die höchste getestete Ciprofloxacinkonzentration (6 x MHK) erfolgte. Eine längere Inkubation der Zellen unter dieser hohen Konzentration führte zu einer deutlichen Reduktion der Expression von *recA* und anderer, SOS-unabhängiger Gene auf bis zu 30 %. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Oh et al., die zeigten, dass hohe Nalidixinsäurekonzentrationen (10 x MHK) nach 2 h eine geringere Induktion der SOS-Gene *polB*, *dinB* und *dinD* verursachten als Konzentrationen nahe der MHK (255). Möglicherweise wurde durch diese längere Inkubation bereits ein Großteil der Zellen derart geschädigt, dass neben dem Verlust der Fähigkeit zur Koloniebildung (Tab. 3-5) auch die Synthese bzw. die Stabilität von mRNAs allgemein beeinträchtigt wurde. Eine beginnende Zelllysis könnte ebenfalls für die Reduktion der mRNAs mitverantwortlich sein.

In Einzelversuchen konnte eine geringere Induktion der *recA*-Expression nach Hemmung von Topo IV sowohl durch Ciprofloxacin (Abb. 3-26) als auch durch Norfloxacin (Abb. 3-28) festgestellt werden ebenso wie eine insgesamt geringere Induktion durch Norfloxacin im Vergleich zu Ciprofloxacin. Untersuchungen zur Induktion von *sulA*, einem anderen Gen des SOS-Regulons, zeigten ebenfalls eine stärkere Induktion nach Hemmung von Gyrase, als von

Topo IV durch Norfloxacin (182). Die mit zunehmender Inkubationszeit ansteigende *recA*-Expression (Abb. 3-25 bis 3-28) deutet auf eine Zunahme der DNA-Schädigung in Anwesenheit der Fluorchinolone. Die wenigen Studien, in denen eine Induktion der SOS-Antwort nach Hemmung von Gyrase durch Nalidixinsäure oder Ciprofloxacin über einen längeren Zeitraum (2 h) untersucht wurde, zeigen ebenfalls eine stetige Zunahme der Expression verschiedener SOS-Gene wie *recA*, *polB*, *dinB* und *dinD* (255, 331). Die *recA*-Induktion durch Ciprofloxacin unterschied sich im zeitlichen Profil von der Induktion durch Norfloxacin (vergleiche Abb. 3-24 und 3-26). Im Gegensatz zur Hemmung von Gyrase durch Norfloxacin führte die Hemmung durch Ciprofloxacin nach 2 h zu einem vorübergehenden Rückgang der *recA*-Expression um ca. 32 %, begleitet von einer signifikanten Reduktion der *agaY*- und *parE*-Transkripte um ca. 66 % bzw. 22 % (Abb. 3-25). Eine temporäre Abnahme der Induktion eines SOS-Gens konnte auch für *recN* nach 160 min und 220 min während der Inkubation mit dem alkylierenden Agens MMS gezeigt werden (333). Eine Verringerung der Expression von SOS-Genen wie *recA* oder *recN* erfolgt in der Regel nach einer Reparatur von DNA-Schäden (338). Da sich jedoch auch die Expression SOS-unabhängiger Gene reduzierte (Abb. 3-25), könnten auch zunehmende Zellschäden oder eine abnehmende Stabilität von mRNAs für die Reduktion verantwortlich sein. Die nach 3 h wieder gestiegene *recA*-Expression (Abb. 3-25) resultiert möglicherweise aus einer zunehmenden DNA-Schädigung in weniger teilungsaktiven Zellen der Kultur oder einer verstärkten Reparaturaktivität. Eine Reparatur von Ciprofloxacin- und Norfloxacin-induzierten DNA-Schäden durch homologe Rekombination konnte in mehreren Studien gezeigt werden (182, 199), und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls auf eine Beteiligung von homologer Rekombination an der Reparatur von Moxifloxacin-induzierten DNA-Schäden nach Hemmung von Gyrase und Topo IV (Abb. 3-5).

Da für die Entstehung der zytotoxischen DNA-Doppelstrangbrüche eine Kollision der ternären Komplexe mit replikativen Helicasen oder RNA-Polymerasen in Verbindung mit der Induktion von DNA-Reparaturprozessen postuliert wird (143, 303, 354), ist eine aktive Replikation bzw. Transkription Voraussetzung für die zytotoxische Wirkung von „topoisomerase-poisons“. Eine Verlangsamung von Replikation oder Transkription, z. B. infolge einer verringerten Wachstumsrate, führt zu einer geringeren Absterberate (75), eine Vergrößerung der Anzahl an replikativen Helicasen hingegen zu einer Zunahme der Absterberate (182). Teilungsinaktive Zellen oder Zellen, deren Transkription durch Rifampicin gehemmt wurde, waren gänzlich unempfindlich gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Chinolonen der 1. Generation, wie Nalidixinsäure (75, 119, 310). Einige Studien zeigten, dass Fluorchinolone, wie z. B. Ciprofloxacin, auch bei gehemmter Proteinbiosynthese oder Transkription zu einem Verlust der Koloniebildungsfähigkeit führten und schlossen daher auf zusätzliche bakterizide Mechanismen dieser Substanzen (122, 156, 201, 212, 278, 308).

Die Stabilitäten der ternären Gyrase- und Topo IV-Komplexe mit Dual-Target-Inhibitoren wie Moxifloxacin sind am höchsten (148, 292) und selbst die Halbwertszeit der etwas weniger stabilen Komplexe mit Ciprofloxacin beträgt *in vitro* einige Stunden (291). Es ist daher wahrscheinlich, dass ein Teil dieser Komplexe zum Zeitpunkt der Wiederaufnahme von Replikation und Transkription, d.h. nach dem Ausplattieren auf Inhibitor-freie Agarplatten, noch Bestand hat, und erst durch diese erneuten Wachstumsprozesse letale DNA-Läsionen induziert werden.

Die Ergebnisse aus 3.1.2.2 stützen diese Annahme, da nach dem Auswaschen von Norfloxacin oder Moxifloxacin und der Wiederaufnahme der Proteinbiosynthese und der Replikation eine zunehmende Filamentierung nur in solchen Kulturen des Stammes WT auftrat, die zuvor mit Moxifloxacin inkubiert wurden. Eine entsprechende Zunahme der Filamentierung nach dem Auswaschen des Antibiotikums wurde auch in solchen *E. coli*-Kulturen nachgewiesen, die zuvor mit Ciprofloxacin + Chloramphenicol inkubiert wurden (352).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fluorchinolone aus der Gruppe I (Norfloxacin), Gruppe II (Ciprofloxacin) und Gruppe IV (Moxifloxacin) nach Hemmung von Gyrase bzw. Topo IV in teilungsinaktiven Kulturen von WT-4 und WT-3-1 weder Filamentierung noch Lysis verursachten, jedoch entsprechend ihrer vermeintlichen Komplexstabilität mit Gyrase und Topo IV unterschiedlich stark die Fähigkeit zur erneuten Koloniebildung reduzierten (3.1.2.2). Im Einklang mit früheren Untersuchungen (72) verursachten Norfloxacin und Ciprofloxacin auch in teilungsinaktiven Zellen eine signifikante Reduktion der Fähigkeit zur erneuten Koloniebildung, sofern sehr hohe Konzentrationen (250 µg/ml) eingesetzt wurden und die Kulturen zuvor eine hohe Teilungsrate aufwiesen (Abb. 3-6 und 3-7). Diese Ergebnisse deuteten auf eine höhere Anzahl an ternären Komplexen in diesen Zellen, möglicherweise aufgrund einer höheren Anzahl an Gyrase- und Topo IV-Molekülen. Messungen der Transkriptmengen von *parC*, *parE* und *gyrA* unter diesen Wachstumsbedingungen (Abb. 3-18) lassen auf eine höhere Konzentrationen an Gyrase und Topo IV in solchen Zellen schließen, die exponentiell wachsenden Kulturen entstammten, so dass unter hohen Fluorchinolonkonzentrationen mehr ternäre Komplexe ausgebildet werden können. Auf diese Weise könnten selbst einige der weniger stabilen ternären Komplexe, die sich mit Norfloxacin oder Ciprofloxacin bilden, bestehen bleiben und bei erneut einsetzender Replikation oder Transkription eine irreversible Zellschädigung verursachen. Für die geringe Empfindlichkeit von Zellen aus der stationären Phase könnte neben der verminderten Anzahl von Topoisomerase-Molekülen auch die Bindung von SbmC an Gyrase verantwortlich sein. Dieser Inhibitor wird in der stationären Phase gebildet (20, 242, 253) und schützt Gyrase vor „topoisomerase poisons“, wie z. B. Chinolonen (55). In PBS inkubierte Kulturen wiesen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin auf als solche, die mit Chloramphenicol

behandelt wurden (Abb. 3-4). Für diese höhere Empfindlichkeit ist möglicherweise eine verbleibende Transkriptionsaktivität zur Adaptation der Zellen an Nährstoffmangel (281) verantwortlich, indem die RNA-Polymerasen bei Kollision mit ternären Komplexen eine DNA-Schädigung verursachen (354). Diese Interpretation der vorliegenden Ergebnisse bedeutet gleichzeitig, dass sich die von Smith (308) postulierten und auch in neueren Publikationen (122, 351) aufgegriffenen bakteriziden Wirkungsmechanismen (A, B, C) von strukturell unterschiedlichen Chinolonen und Fluorchinolonen weniger qualitativ, als vielmehr quantitativ unterscheiden. Mit zunehmender Stabilität der gebildeten ternären Komplexe treten die postulierten Wirkungsmechanismen in der Reihenfolge A–C–B auf. Diese Annahme wird auch von Brighty & Gootz (41) erwogen. Chinolone, die mit Gyrase und Topo IV nur wenig stabile Komplexe eingehen (z. B. Nalidixinsäure) wirken nur auf wachstums- und teilungsaktive Zellen bakterizid, da nur hier ternäre Komplexe schnell in zytotoxische Läsionen verwandelt werden (Mechanismus A). Die Wirkung von Norfloxacin, das eine höhere Komplexstabilität induziert und eine geringe Reduktion der Koloniebildungsfähigkeit von teilungsinaktiven Zellen in PBS, nicht jedoch von solchen nach einer Chloramphenicolbehandlung verursachte (280, 367), wurde mit Mechanismus C beschrieben. Für die Wirkung von Ciprofloxacin, das eine wiederum höhere Komplexstabilität verursacht, wurde schließlich Mechanismus B postuliert, da es die Fähigkeit zur Koloniebildung auch in teilungsinaktiven Zellen reduziert, die mit Chloramphenicol behandelt wurden (279). Die relativ geringe Komplexstabilität von Norfloxacin und Ciprofloxacin mit Topo IV (290) bewirkt dementsprechend keine Beeinträchtigung der erneuten Koloniebildung von teilungsinaktiven Zellen mit resistenter Gyrase (72, 200). Der Dual-Target-Inhibitor Moxifloxacin, der mit Gyrase und Topo IV jeweils stabile ternäre Komplexe einght (290), verhinderte demgegenüber – unabhängig davon, welche Zielstruktur gehemmt wird – eine erneute Koloniebildung auch in teilungsinaktiven Zellen (Abb. 3-5). Unter therapeutischem Aspekt ist eine hohe Komplexstabilität mit Gyrase und Topo IV, die durch Fluorchinolone der Gruppe IV (z. B. Moxifloxacin) erreicht wird, entscheidend für ihre hohe Wirksamkeit gegenüber grampositiven sowie langsam wachsenden oder vorübergehend teilungsinaktiven Bakterien.

4.2 Wirkung anderer Inhibitoren auf Gyrase und Topo IV

4.2.1 Wirkung von Etoposid

Etoposid ist ein Epipodophyllotoxin, das in der Tumorthherapie eingesetzt wird und wie Chinolone als irreversibler Inhibitor von Typ II Topoisomerasen („topoisomerase poison“) wirkt. Entsprechend dem Wirkungsmechanismus dieser Inhibitoren sind eukaryontische Zellen mit einer verringerten Anzahl an Topo II-Enzymen weniger empfindlich gegenüber Etoposid (271). *In vitro*-Studien zeigten, dass Mutationen in Topo II von *S. cerevisiae*, die einen Aminosäureaustausch von Serin zu Tryptophan in der α 4-Helix verursachten – homolog zum Austausch S83W in GyrA von *E. coli* – zu einer Resistenz gegenüber Fluorchinolonen wie CP-115,953, aber einer Hypersensitivität gegenüber Etoposid führten (160). Nachdem dieser Befund auch für *E. coli*-Gyrase *in vitro* gezeigt wurde (127), sollte untersucht werden, ob ein derartiger Empfindlichkeitsunterschied verschiedener *gyrA*-Allele für Etoposid auch *in vivo* zu beobachten ist, oder ob Topo IV *in vivo* auch eine Zielstruktur für Etoposid darstellt. *E. coli* besitzt eine natürlichen Resistenz gegenüber Etoposid, wie Empfindlichkeitstestungen (Tab. 3-2) zeigten. Diese Resistenz beruht vermutlich auf einer reduzierten Akkumulation der Substanz infolge effizient arbeitender Effluxpumpen. Für die Untersuchung der zellulären Empfindlichkeit sollten daher Mutanten verwendet werden, denen das transmembrane Tunnelprotein TolC, ein wichtiger Bestandteil verschiedener RND-Effluxpumpen (340, 358), fehlt. Ein Funktionsverlust derartiger Effluxpumpen, entweder aufgrund einer *tolC*-Mutation in der Mutante DE112 (334), oder durch Hemmung der RND-Pumpen durch den spezifischen Inhibitor MC-207,110 (209), verursachte eine Hypersensitivität nicht nur gegenüber bekannten Substraten dieser Pumpen, wie Chloramphenicol oder Ciprofloxacin, sondern vor allem gegenüber Etoposid (Tab. 3-6). Diese Ergebnisse zeigten somit, dass der Efflux via RND-Pumpen maßgeblich zur natürlichen Resistenz von *E. coli* gegenüber Etoposid beiträgt.

Um den Einfluss der *gyrA*^{S83W}-Mutation auf die zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Etoposid untersuchen zu können, sollte diese Mutation in die hypersensitive Mutante DE112 eingekreuzt werden. Die *gyrA*^{S83W}-Mutation konnte erfolgreich durch homologe Rekombination mittels des in dieser Arbeit konstruierten Suicide-Vektors pMAK705-242 in den Wildtyp-Stamm RFM443, nicht jedoch in die isogene *tolC*⁻-Mutante eingekreuzt werden (3.1.3.1). Die Gründe für das Scheitern der Rekombination sind nicht bekannt. Möglicherweise ist die Akkumulation von Fluorchinolonen in dieser *tolC*⁻-Mutante so hoch, dass die Resistenzmutation in *gyrA* nur zu einer geringfügig verminderten Empfindlichkeit des Stamms beiträgt (251) und daher mit den verwendeten Fluorchinolonzkonzentrationen keine entsprechenden Klone aus den vorhandenen Kointegraten selektiert werden konnten.

Die Wirkung von Etoposid wurde daher in Kombination mit dem Effluxpumpeninhibitor

MC-207,110 auf den Wildtyp und die hergestellte *gyrA*^{S83W}-Mutante (RFM443-242.1) getestet. In Konzentrationen nahe der MHK verursachte Etoposid in Wildtyp und der *gyrA*^{S83W}-Mutante einen raschen Verlust der Zellteilungsfähigkeit (Abb. 3-8) begleitet von einer Filamentierung der Zellen (3.1.3.3). Etoposid induziert daher ebenso wie Fluorchinolone bei uneingeschränktem Zellwachstum die SOS-Antwort und führt zu einem vergleichbaren Verlust der Teilungsfähigkeit binnen weniger Stunden.

Die Einbringung der *gyrA*^{S83W}-Mutation, die eine Resistenz gegenüber Fluorchinolonen vermittelte, führte gleichzeitig zu einer Hypersensitivität gegenüber Etoposid (Tab. 3-6 und Abb. 3-8). Diese Ergebnisse zeigen, dass Gyrase auch *in vivo* die primäre Zielstruktur für Etoposid darstellt und sich – anders als in der Enzymfunktion – bezüglich der Enzym-Inhibitor-Interaktion homolog zu Topo II der Hefe *S. cerevisiae* verhält. In dieser Hefe führt eine entsprechende Mutation *in vitro* und *in vivo* ebenfalls zu einer Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und einer Hypersensitivität gegenüber Etoposid (319). Eine Wirkung von Etoposid auf *E. coli* Topo IV konnte *in vivo* mangels Stämmen mit Etoposid-resistenter Gyrase bislang nicht untersucht werden. *In vitro*-Studien mit Topo IV von *S. aureus* zeigten allerdings, dass Chinolonresistenzmutationen in Topo IV auch zu einer Resistenz gegenüber Etoposid führten, so dass bezüglich der Enzym-Inhibitor-Interaktion keine Homologie von Topo IV zu eukaryontischer Topo II besteht (5). Aufgrund der hohen Homologie der Topo IV-Enzyme von *S. aureus* und *E. coli*, ist eine entsprechende Interaktion von Etoposid auch mit *E. coli* Topo IV zu erwarten. Unterschiede in der Enzym-Inhibitor-Interaktion von Gyrase und Topo IV konnten in *E. coli* bereits gezeigt werden. So weist Gyrase, ebenso wie eukaryontische Topo II, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen wie CP-115,953 und CP-115,955 (4-Hydroxyphenylgruppe am C-7) als gegenüber Ciprofloxacin (Piperazinring am C-7) auf, während sich die Empfindlichkeit von Topo IV genau entgegengesetzt verhält (4). Ein weiterer Unterschied besteht in der Empfindlichkeit gegenüber dem Flavon Rutin (s. u.). Während *E. coli* Gyrase und Kalbsthymus Topo II die gleiche Empfindlichkeit aufwiesen, war *E. coli* Topo IV 50fach empfindlicher (26).

4.2.2 Wirkung von Rutin

Das Flavon Rutin ist ein glykosyliertes Derivat von Quercetin und konnte *in vitro* als selektiver Inhibitor von Topo IV in *E. coli* und *S. aureus* identifiziert werden, da es Topo IV nicht aber Gyrase hemmte (26). Flavone wirken wie Chinolone und Epipodophyllotoxine als „topoisomerase poisons“, indem sie ternäre Komplexe stabilisieren (13, 34, 256). In der vorliegenden Arbeit wurde *in vivo* die Wirkung auf *E. coli* WT, WT-4 und WT-3-1 untersucht. Die natürliche Unempfindlichkeit von *E. coli* gegenüber Rutin resultierte nicht aus einem erhöhten Efflux, da die *tolC*⁻-Mutante ebenfalls unempfindlich war (3.1.4), sondern vermutlich

aus einem geringen Influx. Diese Annahme wird von Untersuchungen gestützt, die eine wachstumshemmende Wirkung von Rutin nur auf permeable *E. coli*-Stämme zeigen konnten (26). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die verwendeten Stämme mit subinhibitorischen Konzentrationen Polymyxin B Nonapeptid permeabilisiert (87, 332), was ihre Empfindlichkeit um mindestens den Faktor 2 erhöhte (vergl. Tab. 3-2 mit Abb. 3-9). Im Vergleich zu den Stämmen WT und WT-3-1 mit Wildtyp Topo IV war WT-4 (*parC*^{S80I}-Mutation) jedoch weniger empfindlich (Abb. 3-9). Dieses Ergebnis zeigt, dass Topo IV auch *in vivo* als primäre Zielstruktur für Rutin fungiert und möglicherweise eine überlappende Bindung von Fluorchinolonen und Rutin innerhalb der „quinolone binding box“ stattfindet, die durch die *parC*^{S80I}-Mutation verringert wird. Eine solche „quinolone binding box“ wurde bislang nur für Gyrase beschrieben (133), kann jedoch aufgrund der Aminosäure-Homologie zwischen GyrA und ParC auch für Topo IV angenommen werden. Die Hemmung von Topo IV führte unter den getesteten Konzentrationen (bis 2 x MHK) zu einer Einschränkung, nicht aber einem Verlust der Teilungsfähigkeit (Abb. 3-9), wie er unter Chinolonen (Tab. 3-5), Etoposid (Abb. 3-8) oder Novobiocin (Abb. 3-11) auftrat. Rutin verursachte jedoch bereits in subinhibitorischen Konzentrationen (1/4 x MHK) eine Filamentierung, die mit steigender Konzentration zunahm (3.1.4) und auf eine Induktion der SOS-Antwort infolge einer Hemmung von Topo IV deutet. Eine Induktion der SOS-Antwort konnte auch von Bernard et al. gezeigt werden (26). Das vereinzelte Auftreten von Cytoplasmaextrusionen an den Septen (siehe 3.1.4) könnte ein Hinweis auf eine letale Schädigung einzelner Zellen sein. Insgesamt wurden jedoch durch Rutin deutlich weniger Zellschäden verursacht als durch Chinolone, so dass möglicherweise eine effizientere Reparatur stattfindet, oder die Stabilität von Rutin-DNA-Topo IV-Komplexen geringer ist als von entsprechenden Chinolon-Komplexen. Die selektive Hemmung von Topo IV durch Rutin bei gleichzeitiger Unempfindlichkeit von Gyrase und Kalbsthymus Topo II (26) verdeutlicht den Unterschied zwischen Gyrase und Topo IV bzw. die Homologie von Gyrase und eukaryontischer Topo II bezüglich ihrer Interaktion mit solchen irreversiblen Inhibitoren.

4.2.3 Wirkung von Novobiocin

Novobiocin zählt zu den Aminocumarinen, die im Gegensatz zu Chinolonen, Epipodophyllotoxinen oder Flavonen keine „topoisomerase poisons“ sondern katalytische Inhibitoren der B-Untereinheiten von Gyrase und Topo IV darstellen (183, 240, 241, 258, 263). Da Topo IV nur die sekundäre Zielstruktur für Novobiocin ist (130, 183), können die für WT, WT-4 und WT-3-1 beschriebenen zellulären Auswirkungen – zumindest für Konzentrationen bis zur MHK – auf eine Hemmung von Gyrase zurückgeführt werden.

Die Bestimmung der zellulären Empfindlichkeit gegenüber Novobiocin (3.1.5) zeigte, dass diese – ebenso wie gegenüber Chinolonen – in LB-Medium um das 4-8fache geringer ausfiel als in

MH-Bouillon. Wie bereits unter 2.1 diskutiert, spielt möglicherweise die fehlende Glucose oder eine vielleicht höhere Magnesiumkonzentration eine Rolle für die geringere Empfindlichkeit in LB-Medium. Bereits subinhibitorische Novobiocinkonzentrationen ($1/16 - 1/8 \times \text{MHK}$) verursachten durch die Hemmung von Gyrase in exponentiell wachsenden Kulturen von WT-4 und WT-3-1 einen raschen und 5 h anhaltenden Zellteilungsstopp, wonach ein erneutes exponentielles Wachstum der Kultur erfolgte (Abb. 3-10). Durch höhere Konzentrationen im Bereich der MHK wurde jedoch nach 5 h die Fähigkeit zur Koloniebildung beider Stämme auf 0,1–1 % reduziert, wobei eine längere Inkubation allerdings – anders als bei Chinolonen – nicht zu einem weiteren Verlust der Teilungsfähigkeit, sondern wieder zu einer Zunahme führte (Abb. 3-11). Annähernd identische Ergebnisse wurden für *E. coli* ATCC 25922 mit entsprechenden Novobiocinkonzentrationen in MH-Bouillon erzielt (287). Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls einen raschen Zellteilungsstopp verbunden mit einer Bakteriostase über 2 h (309) oder eine Reduktion der teilungsfähigen Zellen auf bis zu 0,01 % nach Inkubation von *E. coli* mit subinhibitorischen (130, 202, 261) oder inhibitorischen (2) Novobiocinkonzentrationen beobachten. Konzentrationen, die dem 4-8fachen der MHK entsprechen, reduzierten den Anteil teilungsfähiger Zellen dauerhaft auf weniger als 0,01 % (3.1.5) ohne erkennbare Anzeichen einer Zelllysis. Eine Zelllysis konnte in verschiedenen *E. coli*-Stämmen auch bei hohen Cumarinkonzentrationen nicht nachgewiesen werden (309), jedoch in einigen Archaeobakterien (305).

Die Hemmung von Gyrase durch Novobiocin verursacht einen Stopp oder zumindest eine starke Verlangsamung der Replikationsgabel und somit der DNA-Synthese (183, 309). Da die relaxierende Aktivität von Topo I und Topo IV unter diesen Bedingungen nicht gehemmt wird, kommt es zu einer Reduktion des DNA-Überspiralisierungsgrads (115). Dadurch wird die Initiation der Replikation (108, 217), der Rekombination (233) und der Transkription einer Vielzahl von Genen gestört (9, 61, 273) und es wird neben der Zellteilung auch das Zellwachstum gehemmt. Durch den geringeren DNA-Überspiralisierungsgrad wird allerdings die Transkription der Gyrasegene induziert und verstärkt Gyrase synthetisiert (229, 312). Da katalytische Inhibitoren nur die Enzymfunktion einschränken, kompensiert eine höhere Anzahl von Topoisomerasen teilweise den Funktionsverlust, und die Zellen werden somit unempfindlicher (76, 151, 166). Die für WT-3-1 festgestellte höhere Empfindlichkeit gegenüber Novobiocin (Abb. 3-11) lässt sich andererseits mit einer möglicherweise eingeschränkten Funktion der GyrA^{S83L, D87G}-Gyrase erklären, da auch ein Funktionsverlust aufgrund eines Enzymmangels die Empfindlichkeit gegenüber katalytischen Inhibitoren erhöht (151). Sobald die intrazelluläre Novobiocinkonzentration nicht mehr ausreicht, um alle neusynthetisierten Gyrase-Moleküle zu hemmen, kann der DNA-Überspiralisierungsgrad wieder hergestellt werden (257) und erneutes Wachstum und Zellteilung stattfinden. Dies erklärt die mit steigender Novobiocinkonzentration länger andauernde Wachstumshemmung (3.1.5). Die beobachtete

Reduktion teilungsfähiger Zellen unter höheren Novobiocinkonzentrationen (3.1.5) könnte mit dem Verlust der Rekombinationsfähigkeit aufgrund eines sehr niedrigen DNA-Überspiralisierungsgrads (233, 257) erklärt werden. Rekombination ist essentiell für die Reinitiation gestoppter und zerfallener Replikationsgabeln (70, 155). Gari et al. postulierten, dass jeder Stopp der Replikationsgabel bei uneingeschränktem Wachstum zu DNA-Schäden und zur Induktion der SOS-Antwort führt (110, 111). Diese Annahme wird durch Untersuchungen bestätigt, die eine Induktion der SOS-Antwort nach einem Stopp der Replikationsgabel an künstlichen Terminationssequenzen (*ter*-Sites) zeigen (323). Die Induktion der SOS-Antwort durch Cumarine wie Novobiocin oder Coumermycin A₁ wird allerdings in der Literatur kontrovers diskutiert. Untersuchungen an *E. coli* zeigen eine Induktion der SOS-Antwort durch Cumarine (225, 307, 333) oder lassen aufgrund beobachteter Filamentierung (44) oder Freisetzung von λ -Prophagen (309) auf eine solche Induktion schließen. In einer anderen Studie mit *Haemophilus influenzae* konnte hingegen keine Induktion der SOS-Antwort durch Novobiocin nachgewiesen werden (117).

Novobiocin verursachte in den Stämmen WT-4 und WT-3-1 im Gegensatz zu Chinolonen, Etoposid oder Rutin keine Filamentierung, sondern lediglich eine Verlängerung der Zellen auf das 3fache ihrer normalen Länge (Abb. 3-12), vermutlich aufgrund einer Verlangsamung der Replikationsgabel (183). Unter Konzentrationen, die zu einem Verlust der Teilungsfähigkeit führten, trat diese Zellverlängerung erst nach 19 h oder gar 25 h auf (3.1.5). Möglicherweise wurde der DNA-Überspiralisierungsgrad erst nach dieser Zeit wieder soweit hergestellt, dass ein normales Zellwachstum aber eine zunächst noch verlangsamte Replikation stattfand und daher verlängerte Zellen entstanden.

Novobiocinkonzentrationen, die eine Bakterio­stase verursachten, induzierten die Expression von *recA* maximal um den Faktor 2,4-3,2 (Abb. 3-19 und 3-20). Diese Induktion entspricht in etwa der Induktion, die in der stationären Wachstumsphase (Faktor 2,5) sowie nach einem Kälteschock (Faktor 3,5) gemessen wurde (Abb. 3-18 und 3-21) und zeigt die beschriebene Abhängigkeit der *recA*-Expression vom DNA-Twist bzw. Überspiralisierungsgrad (229, 331, 345). Andererseits führte auch die Hemmung von Topo IV durch eine bakterio­statische Norfloxacin­konzentration, die nachweislich eine Zellfilamentierung als Anzeichen einer induzierten SOS-Antwort verursachte (3.1.2.1), zu einer vergleichbaren Expression von *recA* (Abb. 3-27). Eine Induktion der SOS-Antwort durch Novobiocin aufgrund des Zerfalls von Replikationsgabeln kann daher nicht ausgeschlossen werden. Um eine Induktion der SOS-Antwort durch Novobiocin zu bestätigen oder auszuschließen, sind weitere Expressions­untersuchungen von anderen SOS-Genen (z. B. *sulA*) notwendig, die nicht durch einen verringerten DNA-Überspiralisierungsgrad induziert werden.

4.3 Regulation der Transkription von *parC* und *parE*

Topo IV ist aufgrund ihrer relaxierenden Aktivität neben Gyrase und Topo I an der Aufrechterhaltung des globalen DNA-Überspiralisierungsgrads beteiligt (365). Eine Regulation der Transkription der beiden Strukturgene *parC* und *parE* durch den DNA-Überspiralisierungsgrad wie bei *gyrA/B* erschien daher denkbar. Da die zelluläre Menge von Typ II Topoisomerasen, wie z. B. Gyrase und Topo IV, die Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Inhibitoren beeinflusst (182, 192, 355), ist die Kenntnis der jeweiligen Genexpression von besonderer Bedeutung. Erste Hinweise auf eine Regulation der Topo IV-Expression in Abhängigkeit von der Wachstumsphase lieferten daher Ergebnisse (Abb. 3-6), die eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin in solchen *E. coli* WT-3-1-Kulturen zeigten, deren Vorkulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase stammten, während die Kulturen unempfindlicher waren, wenn die Vorkulturen der stationären Wachstumsphase entstammten.

Da in Bakterien die Menge eines Proteins am stärksten über die Initiation der Transkription seines Gens reguliert wird, sollte die Transkriptionskontrolle von *parC* und *parE*, den beiden Strukturgenen von Topo IV, näher untersucht werden. Neben neuen Erkenntnissen bezüglich der Transkriptionsregulation der Topo IV-Gene sollten diese Untersuchungen auch ein besseres Verständnis der zellulären Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren von Topo IV unter verschiedenen Umweltbedingungen liefern.

Zur Charakterisierung der Transkriptionsregulation wurden die Transkriptionsstartpunkte sowie mögliche Promotorelemente von *parC* und *parE* bestimmt und die spezifischen mRNA-Konzentrationen unter verschiedenen, den DNA-Überspiralisierungsgrad modulierenden Bedingungen quantifiziert.

Die Untersuchungen zur Transkriptionsregulation erforderten zunächst die Präparation von Gesamt-RNA, deren Quantifizierung durch Messung der Absorption bei 260 nm oder des spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs RiboGreen[®] identische Ergebnisse lieferte (3.2.1, [48]). Die Hemmung des exponentiellen Wachstums einer Kultur infolge steigender Zelldichte oder einer Novobiocinbehandlung führte allerdings unabhängig von der optischen Dichte der Kultur zu einer Reduzierung des Gesamt-RNA-Gehalts (Abb. 3-13 und 3-14). Eine solche Abnahme der RNA-Menge pro Zellmasse konnte auch in Abhängigkeit einer steigenden Generationszeit, d. h. eines langsameren Kulturwachstums, festgestellt werden (64, 204). Kulturen, die mit Ciprofloxacin behandelt wurden und trotz Hemmung der Zellteilung über 90 min keine Wachstumshemmung erfuhren, wiesen demgegenüber keinen reduzierten RNA-Gehalt auf (Abb. 3-14). Zusammen zeigten diese Ergebnisse, dass der RNA-Gehalt einer Kultur stark vom Zellwachstum abhängt und nicht mit der optischen Dichte der Kultur korreliert. Für Studien, in denen die Genexpression unter verschiedenen Kulturbedingungen mit einem Einfluss auf das

Zellwachstum oder die Zellteilung untersucht wird, kann daher weder die Zellzahl noch die optische Dichte für die Normalisierung unterschiedlicher RNA-Mengen verwendet werden. Zur Umgehung dieses Problems wurden entsprechend dem Vorschlag von Bustin (47) definierte Gesamt-RNA-Mengen in die reverse Transkription eingesetzt und alle Expressionsdaten hierauf bezogen.

4.3.1 Transkriptionsstartpunkte und Promotoren

In Bakterien wird die Genexpression am stärksten über die Initiation der Transkription reguliert. Diese erfolgt durch die Bindung der aus vier Arten von Untereinheiten bestehenden RNA-Polymerase ($\alpha 2\beta\beta'\sigma$) an eine als Promotor bezeichnete spezifische DNA-Sequenz, an der die Doppelhelix aufgeschmolzen wird („open complex“). Dabei verändert der an das Polymerase-Core-Enzym ($\alpha 2\beta\beta'$) bindende σ -Faktor die Sequenzspezifität der DNA-Bindung des Holoenzym (210), und *E. coli* kann durch den Austausch von 7 homologen σ -Faktoren das Muster der exprimierten Gene zur Anpassung an veränderte Umweltbedingungen modulieren (214). In *E. coli* fungiert σ^{70} als „housekeeping“ σ -Faktor. Das σ^{70} -Holoenzym ist verantwortlich für die Transkription von Genen, die essentiell sind für die Biosynthese von Aminosäuren, Nukleotiden, Enzym-Cofaktoren, Zellwand- und Membrankomponenten sowie von Enzymen die im Kohlenhydratstoffwechsel benötigt werden (124, 139). Promotoren, die von σ^{70} erkannt werden, zeichnen sich durch eine sogenannte -10- und -35-Region aus (siehe Abb. 1-3), an die das Holoenzym bindet. Beide Regionen sind voneinander durch eine meist 17 bp lange Sequenz getrennt, so dass die Ausrichtung der Regionen zueinander durch einen verringerten DNA-Überspiralisierungsgrad derart verändert wird, dass die Initiation der Transkription reduziert wird (9, 61, 250, 273, 345).

Die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte und der stromaufwärts liegenden Promotorsequenzen liefert wichtige Hinweise auf die Art der Regulation der Transkription und die daran möglicherweise beteiligten Faktoren. Für *parC* und *parE* wurden die Transkriptionsstartpunkte durch ein in dieser Arbeit neu entwickeltes Verfahren bestimmt, das auf einer klassischen Primerverlängerungs-Reaktion basiert (3.2.4). Unter exponentiellen Wachstumsbedingungen wurde für *parC* und *parE* ein Guanin als primärer, häufigster Transkriptionsstartpunkt 51 bp (*parC*) bzw. 55 bp (*parE*) stromaufwärts des Translationsstarts bestimmt (Tab. 3-11). Purinbasen wie Adenin und Guanin stellen die häufigsten Transkriptionsstartpunkte in *E. coli* dar (131). Die softwareunterstützte Analyse (284) des Sequenzbereiches stromaufwärts der ermittelten Gen-nahen Startpunkte (P1) zeigte für beide Gene Bindemotive eines σ^{70} -Promotors mit dem typischen Abstand von 17 bp zwischen der -10- und -35-Region (Tab. 3-11). Mit Ausnahme der -10-Region bei *parE* weisen diese Bindemotive jeweils eine hohe Homologie zur entsprechenden Konsensussequenz von σ^{70} -Promotoren

([141], Tab. 3-11) auf. Eine weitere Homologie zu σ^{70} -Promotoren ergibt sich aus dem Abstand zwischen dem Transkriptionsstart und der möglichen -10 -Region. Dieser betrug für die postulierten P1-Promotoren 4 bp (*parC*, Abb. 3-16) bzw. 7 bp (*parE*, Abb. 3-17) und entspricht somit dem häufigen Abstand von 4-12 bp bzw. von 7 ± 1 bp bei 75 % der σ^{70} -Promotoren (131, 141). Der bislang von Peng & Mariani (263) postulierte Transkriptionsstart von *parC* erfolgt an einem Cytosin eine Base stromaufwärts (-1) von P1. Allerdings wurde von Peng & Mariani ein σ^{70} -abhängiger Promotor postuliert, der im Vergleich zu P1 weiter stromaufwärts liegt und eine -10 - und -35 -Regionen mit geringerer Homologie zur Konsensussequenz (Tab. 3-11) und einem für σ^{70} -Promotoren untypischen Abstand von 22 bp aufweist (Tab. 3-11, [141, 263]). Ein anderer Transkriptionsstart für *parC* wurde aufgrund von Sequenzvergleichen von Salgado et al. postuliert. Dieser befindet sich an einem für σ^{70} -Promotoren eher ungewöhnlichen Thymin an Position -10 im Vergleich zu P1 (286), und auch hier weist die unmittelbar stromaufwärts liegende DNA-Sequenz (siehe Abb. 3-16) keine Homologie zu bekannten σ^{70} -Promotoren (Tab. 3-11, [141]) auf. Für den Transkriptionsstart von *parE* wurde von Salgado et al. ein Cytosin an Position -66 im Vergleich zu P1 bzw. 9 bp stromabwärts von P3 (Abb. 3-17) postuliert (286).

Neben den primären Transkriptionsstartpunkten P1 wurden unter exponentiellem Kulturwachstum für *parC* und *parE* zusätzliche stromaufwärts gelegene Transkriptionsstartpunkte detektiert (Tab. 3-11, Abb. 3-16 und 3-17). Im Fall von *parC* wurden die beiden zusätzlichen Startpunkte (P2 und P3) jedoch nur mit einer relativen Häufigkeit von etwa 7 % im Vergleich zum primären Transkriptionsstartpunkt benutzt. Ursächlich für diese geringe Transkription ist möglicherweise die geringere Homologie zum Konsensuspromotor einschließlich dem suboptimalen Abstand der σ^{70} -Bindemotive zueinander und zum Transkriptionsstart (Abb. 3-16, Tab. 3-11, [141]). Ein mit entsprechend geringer Häufigkeit (9 %) detektierter Transkriptionsstartpunkt 7 bp stromabwärts von P1 resultierte möglicherweise aus einem vorzeitigen Abbruch der reversen Transkription. Diese Erklärung könnte auch für den ermittelten Transkriptionsstartpunkt 18 bzw. 19 bp stromaufwärts von P2 gelten, für den keine Promotorsequenzen detektiert wurden. Für *parE* wurden stromaufwärts von P1 weitere 4 Transkriptionsstartpunkte mit σ^{70} -Promotoren identifiziert, von denen die beiden nächstgelegenen noch Aktivitäten von 60 % bzw. 70 % im Vergleich zum primären Transkriptionsstartpunkt aufwiesen (3.2.4).

Während der stationären Wachstumsphase, die durch einen geringeren DNA-Überspiralisierungsgrad gekennzeichnet ist (158), wurde für *parC* und *parE* jeweils nur ein Transkriptionsstartpunkt detektiert (Tab. 3-9 und 3-10). Bei *parC* war dieser identisch mit dem unter exponentiellem Wachstum ermittelten Startpunkt P1, während er bei *parE* identisch mit dem entsprechenden Startpunkt P2 war. *E. coli* verwendet demnach unter stationären Wachstumsbedingungen keine speziellen Startpunkte für die Transkription von *parC* und *parE*,

sondern entsprechend dem Promotor P_{x1} von *topA* (275) einen, der auch bei exponentiellem Wachstum verwendet wird. Möglicherweise können die Promotoren P1 (*parC*) und P2 (*parE*) sowohl durch σ^{70} als auch durch das in der stationären Phase vorherrschende σ^S aktiviert werden, wie es für P_{x1} gezeigt wurde (275). Das Fehlen einer Aktivierung der anderen, unter exponentiellen Wachstumsbedingungen verwendeten Promotoren deutet darauf hin, dass diese auf eine Veränderung des DNA-Überspiralisierungsgrads sensibler reagieren und nach dessen Reduktion möglicherweise eine Bindung von σ^{70} - oder σ^S -RNA-Polymerase nicht zulassen.

Die Regulation der Transkription von *parC* und *parE* unterscheidet sich zusätzlich hinsichtlich der möglicherweise beteiligten Transkriptionsfaktoren. Während für *parC* nur ein einzelnes Bindemotiv für H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) stromabwärts des P1 Transkriptionsstarts ermittelt wurde, konnten für *parE* insgesamt drei entsprechende Bindemotive detektiert werden (3.2.5). H-NS nimmt aktiv an der Kontrolle des chromosomalen Überspiralisierungsgrads teil (145, 163) und fungiert möglicherweise als genereller Silencer der Transkription unter bestimmten Wachstumsbedingungen, wie der stationären Phase (10, 265, 329). Die detektierten H-NS-Bindemotive in den Promotorregionen von *parC* und *parE*, deuten daher zusätzlich zu den Promotorsequenzen auf eine vom DNA-Überspiralisierungsgrad abhängige Regulation der Transkription. Die Position des H-NS-Bindemotivs innerhalb des postulierten P1-Promotors von *parE* erklärt zudem die fehlende Transkription von diesem Promotor in der stationären Wachstumsphase. Zur Bestätigung dieser postulierten H-NS-Bindung könnten z. B. ein Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) durchgeführt werden. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Tatsache, dass Protein-DNA-Komplexe bei der gelelektrophoretischen Auftrennung langsamer laufen als pure DNA.

Neben den möglichen Bindemotiven für H-NS weist der Promotorbereich von *parE* jeweils ein mögliches Bindemotiv für TyrR und CRP auf. Entsprechende Bindemotive wurden zwar auch für die stromaufwärts liegende Sequenz des P3-Transkriptionsstarts von *parC* postuliert, jedoch mit einem Abstand von mehr als 300 bp, so dass eine Bindung dieser Transkriptionsfaktoren vermutlich keinen Einfluss auf die Expression von *parC* ausübt. CRP, das cAMP Rezeptorprotein, ist bei ausreichenden cAMP-Spiegeln (z. B. bei Glucosemangel wie in LB-Medium) ein Transkriptionsaktivator, der als Dimer eine starke Biegung in die DNA einführt (357) und somit eine direkte Interaktion mit RNA-Polymerase ermöglicht (88), oder durch den veränderten lokalen DNA-Überspiralisierungsgrad eine Aktivierung des Promotors verursacht (186). Für verschiedene Gene, deren Expression in der stationären Phase einer Batchkultur erhöht ist, konnte eine Kontrolle durch den cAMP-CRP-Komplex nachgewiesen werden (301). Hierzu zählen z. B. die Gene für die Microcin-Produktion (187). Um eine direkte Interaktion mit RNA-Polymerase zu ermöglichen, muss der Abstand zum Transkriptionsstart allerdings mindestens 40 bp betragen (66). Die ermittelte Position der CRP-Bindestelle im P5-Promotor

von *parE* liegt jedoch stromabwärts der -38 Position (Abb. 3-17), so dass CRP eher als Repressor, wie im Fall des *ompA*- oder *galp2*- Promotors, fungieren könnte (66, 236).

TyrR ist ein negativer Transkriptionsregulator für die Expression vieler Gene, die ausschließlich an der Biosynthese und am Transport von aromatischen Aminosäuren beteiligt sind (313). Es bindet spezifisch an eine Gruppe von 22 bp langen Zielsequenzen, die als starke oder schwache TyrR-Boxen bezeichnet werden und stromaufwärts von Position -20, oder unmittelbar stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts liegen (66, 368). Obgleich eine mögliche Bindebox für TyrR im P4-Promotor von *parE* ermittelt wurde, erscheint daher eine Regulation von *parE* durch TyrR unwahrscheinlich, zumal die mögliche Bindebox stromabwärts der Position -20 (Abb. 3-17) liegt.

Unterschiede in der Kontrolle der Expression von *parC* und *parE* ergeben sich möglicherweise zusätzlich aus der jeweils postulierten Ribosomenbindungsstelle (RBS). Die postulierte RBS von *parC* ermöglicht mit ihren ersten 4 Basen eine komplementäre Paarung mit dem 3'-Endes der 16S rRNA (3.2.4) und weist darüber hinaus eine hohe Homologie (5 von 6 Basen) zur RBS-Konsensussequenz (106) auf. Möglicherweise beeinflusst auch die putative H-NS Bindestelle unmittelbar stromaufwärts dieser RBS die Bindung zur 16S rRNA. Für *parE* ermöglicht die postulierte RBS nur mit den ersten und letzten beiden Basen eine entsprechende Paarung mit der 16S rRNA, und der Abstand zum Translationsstart ist mit 12 bp (für *parC* 9 bp) ungewöhnlich lang (106). Effizienzunterschiede in der Translation von *parC* und *parE* können daher nicht ausgeschlossen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit unter exponentiellem Kulturwachstum erstmals experimentell ermittelten primären Transkriptionsstartpunkte P1 von *parC* und *parE* deuten somit in Verbindung mit den postulierten σ^{70} -Promotoren, die jeweils eine hohe Homologie zum Konsensuspromotor aufweisen (Tab. 3-11), auf eine negative Regulation der *parC*- und *parE*-Transkription infolge eines verringerten DNA-Überspiralisierungsgrads. Dabei ist die Transkription von *parE* möglicherweise stärker reguliert, wie die unter exponentiellem Wachstum detektierten 5 Transkriptionsstartpunkte mit jeweils nennenswerter Aktivität (siehe Tab. 3-9 und 3-10) sowie die 3 möglichen Bindemotiven für H-NS vermuten lassen. Die Sequenzen der für *parC* postulierten -10- und -35-Region stromaufwärts von P1 weisen zudem eine hohe Homologie zu den entsprechenden Regionen des P3 Promotors von *topA* auf (Tab. 3-11, [328]). Obgleich die Transkription des für Topo I codierenden *topA*-Gens negativ durch einen abnehmenden und positiv durch einen zunehmenden DNA-Überspiralisierungsgrad beeinflusst wird, ist die Rolle des P3-Promotors für diese Regulation unklar (275, 328).

4.3.2 Einfluss des DNA-Überspiralisierungsgrads

Die Aufrechterhaltung und Regulation eines globalen negativen DNA-Überspiralisierungsgrads

innerhalb enger Grenzen ist für Zellen essentiell (79, 341). Neben der Bedeutung für die Rekombination (233) und die Replikation (108, 217) ist für die Initiation der Transkription einer Vielzahl von Genen ein bestimmter negativer DNA-Überspiralisierungsgrad erforderlich (9, 61, 273). Eine Relaxierung der DNA beeinflusst die Expression einer Vielzahl von Genen negativ, führt aber auch zu einer erhöhten Expression anderer Gene wie *gyrA*, *gyrB* und *recA* (102, 229, 232, 307, 345). Da die Expression von Gyrase und Topo I, die neben Topo IV an der Regulation des DNA-Überspiralisierungsgrads beteiligt sind (365), durch den Überspiralisierungsgrad selbst beeinflusst wird (229, 327), erschien eine solche Regulation auch für Topo IV denkbar. Die ermittelten Transkriptionsstartpunkte für *parC* und *parE* (Tab. 3-9 und 3-10) in Verbindung mit den postulierten σ^{70} -Promotoren und Bindemotiven für Transkriptionsfaktoren wie H-NS und CRP gaben erste konkrete Hinweis auf eine negative Regulation infolge eines verringerten DNA-Überspiralisierungsgrads (siehe 4.3.1).

Zur Verifizierung dieser Hinweise wurde der DNA-Überspiralisierungsgrad experimentell verringert. Hierzu wurde einerseits Gyrase durch das Cumarin Novobiocin gehemmt (83, 229) und andererseits ein Kälteschock induziert. Letzterer bewirkt physikalisch zunächst eine Zunahme des DNA-Twists und verursacht damit ebenfalls eine lokale Verringerung des negativen Überspiralisierungsgrads bevor die Aktivität von Gyrase durch Verringerung der Verknüpfungszahl (Lk) den ursprünglichen DNA-Überspiralisierungsgrad wieder herstellt (211, 345). Aufgrund der Verringerung des DNA-Überspiralisierungsgrads nach Hemmung von Gyrase durch Novobiocin wurde nach 10 min und 30 min eine etwa 1,5fache Induktion der *gyrA*-Expression und eine bis zu 1,7fache Induktion der *recA*-Expression festgestellt (Abb. 3-19). Chromosomal integrierte Fusionen des *gyrA*-Promotors mit *lacZ* zeigten ebenfalls eine 2fach erhöhte Transkription nach Induktion mit Novobiocin (245), während die Induktion durch Coumermycin A₁ eine 4fach (245) oder gar 8,5fach (232) höhere Transkription verursachte. Parallel zur Expressionssteigerung von *gyrA* und *recA* konnte eine Abnahme der Transkripte für *parC* und *parE* mit zunehmender Novobiocinkonzentration (Abb. 3-20) und Inkubationszeit (Abb. 3-19) festgestellt werden, so dass deren Transkription durch einen abnehmenden Überspiralisierungsgrad offenbar negativ reguliert wird. Die Induktion eines Kälteschocks verursachte bezüglich *gyrA* und *recA* die gleichen Expressionsänderungen wie nach der Hemmung von Gyrase durch Novobiocin, während die Reduktion der *parC*-Expression geringer ausfiel und für *parE* sogar eine leichte Steigerung der Expression verzeichnet wurde (vergleiche Abb. 3-20 und 3-21). Die Reduktion des DNA-Überspiralisierungsgrads durch eine gezielte Hemmung von Gyrase oder einen induzierten Kälteschock verursachte demnach eine Repression der *parC*-Transkription, während die Transkription von *parE* weniger beeinflusst wurde, wie bereits die jeweiligen postulierten Promotorstrukturen vermuten ließen (siehe 4.3.1). Diese unterschiedliche Regulation der *parC*- und *parE*-Transkription spiegelt sich auch in der kürzlich festgestellten unterschiedlichen Lokalisierung der beiden Untereinheiten (93).

Weitere Untersuchungen zur Bestätigung der Abhängigkeit des *parC*-, und *parE*-Promotors vom Überspiralisierungsgrad bzw. DNA-Twist könnten eine gezielte Deletion bzw. Insertion einiger Basen in die Region zwischen der -10 und -35-Sequenz beinhalten. Entsprechende Untersuchungen am *flaA*- σ^{28} -Promotor von *H. pylori* (38) zeigten, dass sich hierdurch die Abhängigkeit dieses Promotors vom DNA-Überspiralisierungsgrad modulieren ließ.

Die während des Kälteschocks gemessene starke Reduktion des *srmB*-Transkripts überrascht insoweit, als SrmB, eine RNA-Helicase, vermutlich an der Gruppierung der 50S Untereinheit von Ribosomen beteiligt ist und das Wachstum bei niedrigen Temperaturen verbessert (54). RNA-Helicasen entfernen zudem RNA-Sekundärstrukturen und schützen gleichzeitig mRNA vor einer RNase-vermittelten Degradation (165).

4.3.3 Einfluss von Fluorchinolonen

Der Einfluss von Fluorchinolonen auf die Expression von *parC* und *parE* wurde in der vorliegenden Arbeit nicht explizit untersucht. Dennoch zeigen die Ergebnisse zur Induktion des SOS-Gens *recA* infolge einer gezielten Hemmung von Gyrase (Abb. 3-25 und 3-27) oder Topo IV (Abb. 3-26 und 3-28) durch die beiden Fluorchinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin, dass ausschließlich eine 3stündige Hemmung von Topo IV, nicht jedoch von Gyrase, zu einer Reduktion der *parC*-Expression auf etwa 30 % führte. Dieses Ergebnis verwundert insofern, als dass eine Hemmung des relaxierenden Enzyms Topo IV eher einen höheren DNA-Überspiralisierungsgrad und darüber eine Induktion der *parC*-Expression verursachen würde. Literaturdaten existieren allerdings nur zum Einfluss von Fluorchinolonen auf den DNA-Überspiralisierungsgrad bzw. die Expression von *gyrA* nach Hemmung von Gyrase (117) und bestätigen den gemessenen fehlenden Einfluss (Abb. 3-25 und 3-27). Da die Ergebnisse aus Abb. 3-26 und 3-28 jeweils nur Einzelmessungen repräsentieren, sollten weitergehende Untersuchungen zur Klärung des Einflusses von Fluorchinolonen insbesondere auf die Expression von *parC* nach Hemmung von Topo IV stattfinden.

4.3.4 Einfluss von Topoisomerase-Mutationen

Untersuchungen von Bagel et al. und Schulte (15, 299, 300) haben gezeigt, dass *in vitro* selektierte Chinolonresistenzmutationen in *gyrA* häufig mit einem Fitnessverlust, einem verringerten DNA-Überspiralisierungsgrad und einer geringeren Wachstumsrate der Bakterienstämme einhergehen (Tab. 3-1). Andererseits wiesen klinische Isolate, mit entsprechenden Mutationen sowie Chinolon-resistente Mutanten wie WT-3-1, die durch *in vitro*-Mutagenisierung hergestellt wurden, nur einen geringen Verlust ihrer Fitness und keine verringerte Wachstumsrate auf (Tab. 3-1, [15]). Mutationen, die in den B-Untereinheiten von Gyrase (GyrB^{R136C}, GyrB^{G77S}) und Topo IV (ParE^{R132C}) auftreten oder erzeugt wurden, beeinträchtigten die katalytische Aktivität (68, 125, 130) und führten zumindest bei mutierter Gyrase zu einem verringerten DNA-Überspiralisierungsgrad und geringerer Wachstumsrate (125). Obgleich die Empfindlichkeit solcher Mutanten nicht gegenüber Chinolonen getestet wurde, lässt die verringerte Wachstumsrate und Gyraseaktivität auf eine entsprechend verminderte Empfindlichkeit schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch untersucht, welchen Einfluss verschiedene Gyrase- und Topo IV-Mutationen auf die Expression der Topoisomerasegene ausüben. Bei exponentiellem Wachstum konnten zwischen Wildtyp (WT), WT-4, WT-3-1 und M III-300, die alle annähernd gleiche Generationszeiten aufweisen (Tab. 3-1), keine Unterschiede in der Expression von *parC* und *parE* festgestellt werden (Abb. 3-22). Mit Ausnahme von WT-3-1 war auch die Expression von *gyrA* in diesen Stämmen identisch. Die 2fach höhere *gyrA*-Expression in WT-3-1 resultierte vermutlich aus den nachgewiesenen Mutationen im Promotorbereich, die zur Ausbildung einer zusätzlichen -10-Region für einen σ^{70} -Promotor führten (Abb. 3-23). Diese Mutationen stammten aus dem für die Herstellung von WT-3-1 verwendeten *gyrA*-Allel von *E. coli* 205096, einem gegenüber Chinolonen hochresistenten klinischen Stamm, der durch eine zusätzliche *parC*^{E84K}-Mutation sowie einen erhöhten Efflux charakterisiert ist (135, 136, 292). Die größere *gyrA*-Transkriptmenge in WT-3-1 gibt erstmals einen Hinweis darauf, dass die Funktion der Gyrase in *E. coli* 205096 oder WT-3-1 (GyrA^{S83L, D87G}) möglicherweise beeinträchtigt ist und durch eine erhöhte Expression entsprechend der von Menzel & Gellert postulierten homöostatischen Kontrolle (229) kompensiert wird. Möglicherweise trägt die erhöhte Expression dieser resistenten GyrA-Untereinheit auch zu einer Sensitivierung gegenüber Chinolonen bei. Ein Hinweis hierauf liefert die Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin, die in WT-3-1 um eine MHK-Stufe niedriger liegt als in M I. Stamm M III, der ebenfalls eine *gyrA*^{S83L, D87G}- sowie eine *parC*^{S80I}-Mutation besitzt, wies keine erhöhte Expression von *gyrA* auf, sondern war im Gegenteil durch sehr niedrige Expressionsraten aller Gene charakterisiert (Abb. 3-22), was möglicherweise die verdoppelte Generationszeit (Tab. 3-1) erklärt. Eine homologe kompensatorische Mutation im *gyrA*-Promotorbereich von M III oder M III-300 blieb

vermutlich aus, da aufgrund der Variationen in der DNA-Sequenz dieser Stämme hierzu eine Doppelmutation nötig gewesen wäre. Andererseits ist unbekannt welchen Wachstumsvorteil Stamm WT-3-1 aufgrund der verstärkten Expression von *gyrA* besitzt. Untersuchungen zum Einfluss der Topoisomerasekonzentration auf die Wachstumsrate zeigten, dass eine Verdopplung der Topo I-Konzentration nur eine geringe Veränderung (3 %) der Wachstumsrate verursachte (312).

Die *parC*^{S80I}-Mutation in Stamm WT-4 scheint keinen nennenswerten Einfluss auf die Genexpression und die Bakterienfitness auszuüben. Weder die Expression der untersuchten Topoisomerase-Gene (s. o.) noch von anderen Genen war gegenüber dem Wildtyp verändert (Abb. 3-22). WT-4 und WT wiesen zudem gleiche Generationszeiten (Tab. 3-1) und DNA-Überspiralisierungsgrade auf (14). Diese Ergebnisse werden durch *In vitro*-Untersuchungen zur Enzymaktivität gestützt. Isolierte Topo IV aus WT-4 oder eine Chinolon-resistente Topo IV (*ParC*^{S80Y}) aus *S. aureus* zeigten keine Beeinträchtigung ihrer Enzymfunktion im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (33, 290).

4.3.5 Einfluss der Wachstumsphase

Der Nährstoffmangel, der in der stationären Phase einer Batchkultur auftritt, erfordert für ein weiteres Überleben der Zellen eine Anpassung ihres Stoffwechsels u. a. durch Neusynthese bestimmter Proteine. Während hierfür einige wenige Gene verstärkt transkribiert werden, findet eine generelle Abnahme der Transkription und der Translation statt (96) wie auch die Ergebnisse aus Abb. 3-13 und 3-18 zeigen. Für die erhöhte Transkription von etwa 50 Genen in der stationären Phase ist der spezifische Sigma-Faktor RpoS (σ^S) verantwortlich (167, 195), der auch die Transkription des Promotors P_{x1} des Topoisomerase I-Gens reguliert (275). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Erkennung von σ^S -abhängigen Promotoren an relaxierter DNA effizienter ist (194). In der vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits in der frühen stationären Phase das *agaY*-Transkript, das für Tagatose-1,6-bisphosphat-Aldolase codiert, ein Enzym aus dem alternativen Kohlenhydratstoffwechsel, um den Faktor 8,5 induziert wurde (Abb. 3-18), möglicherweise aufgrund eines aktivierten σ^S -Promotors. Neben diesem spezifischen σ -Faktor ist vermutlich der in der stationären Wachstumsphase reduzierte DNA-Überspiralisierungsgrad für die erhöhte Expression einiger Gene verantwortlich (17, 170, 277, 328). In der vorliegenden Arbeit konnte dementsprechend eine erhöhte Expression von *recA* in der stationären Wachstumsphase festgestellt werden, während allerdings die Expression von *gyrA* abnahm. Möglicherweise sind daher in der stationären Wachstumsphase zusätzliche Faktoren an der Transkriptionsregulation von *gyrA* beteiligt. Die positive Regulation der Transkription von *gyrA* durch CRP (118) bzw. die negative durch FIS (297) erklären allerdings nicht den Expressionsverlust in der stationären Phase, da hier die Konzentration von CRP

unverändert ist und die von FIS stark abnimmt (18). Die gemessene Reduktion der *gyrA*-Expression zu Beginn der stationären Phase (Abb. 3-18) entspricht jedoch Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen mit chromosomal- und plasmid-lokalisierten *gyrA-lacZ*-Fusionen (118, 175, 245). Die Detektion nur eines Transkriptionsstartpunkts für *parC* bzw. *parE* in der stationären Phase sowie die Struktur der für beide Gene postulierten Promotoren in Verbindung mit möglichen Bindestellen für H-NS deutete auf eine Reduktion der Expression in der stationären Phase (4.3.1) und konnte durch die Quantifizierung der Genexpression entsprechend bestätigt werden (Abb. 3-18). Der Transkriptionsregulator H-NS, für den in der Promotorregion von *parC* und *parE* Bindemotive gefunden wurden (Abb. 3-16 und 3-17) akkumuliert in der stationären Phase und reprimiert die von ihm regulierten σ^{70} -abhängigen Promotoren (10, 329). Eine 8stündige Inkubation in stationärer Phase oder eine 2stündige Inkubation unter Nährstoffmangel in PBS führte zu einer Reduktion aller Transkripte um bis zu 90 % (3.2.6.1.1), so dass vermutlich globale Faktoren, wie eine allgemein reduzierte Transkription oder eine verringerte Stabilität der mRNAs für diese Ergebnisse verantwortlich zeichnen.

Die in der stationären Phase ermittelte geringere Transkriptmenge von *parC* und *gyrA* spiegelt möglicherweise geringere Enzymkonzentrationen von Topo IV und Gyrase wider und würde damit zu der beobachteten geringeren Empfindlichkeit solcher Zellen gegenüber Chinolonen (Abb. 3-6) beitragen.

Die neuen Einblicke, die die vorliegende Arbeit in die Wirkungsmechanismen verschiedener Inhibitoren wie Fluorchinolone, Etoposid, Rutin und Novobiocin auf die Topoisomerase IV und Gyrase von *E. coli* liefert, können für ein effizienteres Screening neuer Inhibitoren dieser Zielstrukturen verwendet werden. Insbesondere könnten neue spezifische Inhibitoren von Topo IV oder Gyrase, die ähnlich zu Etoposid ihre volle Wirkung erst in chinolonresistenten Isolaten entfalten, sowie ein besseres Verständnis der Wirkung von Etoposid auf *E. coli* Topo IV entscheidend zur effizienten Bekämpfung der zunehmenden Anzahl resistenter Keime beitragen. Durch die Untersuchung der Transkriptionskontrolle der für Topo IV codierenden Gene *parC* und *parE* konnte die Rolle dieses Enzyms für die Relaxierung von DNA bestätigt werden. Aufgrund der Auswirkungen der Topoisomeraseexpression auf die zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren, ist eine weitergehende experimentelle Analyse und Bestätigung der für die Genregulation von *parC* und *parE* postulierten Transkriptionsfaktoren und Promotorsequenzen wünschenswert.

5 Zusammenfassung / Summary

In Bakterien katalysiert Topoisomerase IV (Topo IV) die Trennung von Tochterchromosomen nach der Replikation und unterstützt durch die Relaxierung von positiv überspiralisierter DNA die Replikation und Rekombination. Topo IV und die strukturell ähnliche Topoisomerase II (Gyrase) sind die Zielstrukturen für die klinisch bedeutsamen Fluorchinolon-Antibiotika. Ziel der vorliegenden Arbeit war es mittels genetisch definierter Mutanten von *E. coli*, in denen entweder Gyrase oder Topo IV als primäre Zielstruktur für Chinolone fungiert, die zellulären Effekte (z. B. Induktion der SOS-Antwort und Verlust der Lebensfähigkeit) nach einer Hemmung von Topo IV oder Gyrase durch verschiedene Fluorchinolone und andere Inhibitoren aufzuklären. Zusätzlich zielte die Studie auf die Aufklärung von Mechanismen, die an der Transkriptionskontrolle von *parC* und *parE*, den beiden Strukturgenen der A- und B-Untereinheit von Topo IV, beteiligt sind und auf mögliche Implikationen für die Konzentration dieser Zielstruktur und damit der zellulären Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren von Topo IV.

In exponentiell wachsenden Kulturen verursachten Fluorchinolone einen Verlust der Lebensfähigkeit und eine Induktion der SOS-Antwort, charakterisiert durch eine Filamentierung der Zellen und eine Induktion der *recA*-Transkription, unabhängig davon, ob Gyrase oder Topo IV die primäre Zielstruktur darstellte. Nach einer Hemmung von Topo IV durch Norfloxacin fiel sowohl die Induktion der SOS-Antwort als auch der Verlust der Lebensfähigkeit geringer aus, als nach entsprechender Hemmung durch Ciprofloxacin oder nach Hemmung von Gyrase durch Ciprofloxacin oder Norfloxacin. Der Verlust der Lebensfähigkeit wurde zudem durch die Zellteilungsrate, die Wachstumsphase und das Kulturmedium beeinflusst. Wachstums- und teilungsinaktive Zellen wurden durch Fluorchinolone nicht abgetötet, jedoch verhinderten solche mit einer hohen Affinität zu Gyrase und Topo IV (wie z. B. Moxifloxacin) am effektivsten die Koloniebildung nach Wiederaufnahme der Zellteilung, insbesondere wenn Gyrase als primäre Zielstruktur fungierte.

Die Untersuchung anderer Inhibitoren zeigte, dass Etoposid, ein Inhibitor eukaryontischer Topoisomerase II-Enzyme, primär Gyrase, während Rutin primär Topo IV hemmte. Beide Inhibitoren induzierten die SOS-Antwort, gezeigt durch Filamentierung von wachsenden Zellen, aber nur Etoposid verursachte auch deren Absterben.

Zudem wurde in Bestätigung früherer *in vitro*-Daten für eine *in vitro* hergestellte chinolonresistenten Mutante (*gyrA*^{S83W}) erstmals eine Hypersensitivität gegenüber Etoposid nachgewiesen, während der chinolonempfindliche Wildtyp gegenüber Etoposid resistent war. In *E. coli* unterscheidet sich daher Topo IV von Gyrase bezüglich der Interaktion mit verschiedenen Inhibitoren und dem Ausmaß der dadurch ausgelösten zellulären Effekte. Die Untersuchungen zeigen, dass Topo IV und Gyrase auch bei der zunehmenden Resistenz

gegenüber Fluorchinolonen vielversprechende antibakterielle Zielstrukturen für bewährte und neue chemische Substanzklassen darstellen.

Die Untersuchung der transkriptionellen Regulation der *parC*- und *parE*-Expression erfolgte unter verschiedenen physiologischen Bedingungen durch Quantifizierung der spezifischen mRNAs mittels real-time RT-PCR und durch eine neu entwickelte Fluoreszenz-basierte Methode zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte.

Die Transkriptionsstartpunkte für *parC* und *parE*, die in dieser Arbeit erstmals experimentell bestimmt wurden, unterschieden sich in Abhängigkeit vom Kulturwachstum in exponentieller und stationärer Phase einer Batchkultur. Sequenzvergleiche der Regionen stromaufwärts der ermittelten Transkriptionsstartpunkte zeigten für beide Strukturgene σ^{70} -abhängige Promotoren sowie potentielle Bindestellen für H-NS. Die postulierten Promotorregionen von *parC* und *parE* deuten auf eine negative Regulation der Transkription in Abhängigkeit eines verringerten DNA-Überspiralisierungsgrads. Eine solche Abhängigkeit konnte vor allem für *parC* und in geringerem Maße für *parE* bestätigt werden. So führte die vorübergehende Relaxierung der DNA durch einen induzierten Kälteschock oder durch Hemmung von Gyrase durch Novobiocin zu einer signifikant geringeren Expression von *parC*. Der Nachweis dieser vom DNA-Überspiralisierungsgrad abhängigen Transkription von *parC* unterstreicht die zelluläre Bedeutung von Topo IV für die Aufrechterhaltung eines globalen negativen Überspiralisierungsgrads der DNA.

Fluorchinolone beeinflussten unabhängig von der Zielstruktur weder die Expression von *gyrA* noch von *parE*, führten allerdings ausschließlich nach Hemmung von Topo IV zu einer Reduktion der *parC*-Expression.

Summary

In bacteria, topoisomerase IV (topo IV) catalyses the decatenation of DNA-daughter chromosomes after replication and drives replication and recombination by relaxation of positive DNA-supercoils. Topo IV and the structurally similar topoisomerase II (gyrase) are both lethal targets of fluoroquinolone antibiotics. By using genetically defined mutants of *E. coli* carrying mutations rendering either gyrase or topo IV to the primary target of quinolones, this study aimed at determining the cellular effects, e.g. induction of the SOS response and loss of viability, triggered by the selective inhibition of either type II topoisomerase with various inhibitors including fluoroquinolones. In addition, the study focused on the elucidation of the mechanisms involved in the transcriptional regulation of the *parC* and *parE* genes encoding the two subunits of topo IV, on possible implications for the target concentration, and thus, the cellular susceptibility to inhibitors of topo IV.

In exponentially growing cultures, fluoroquinolones caused loss of viability and induction of the

SOS response, characterized by filamentation of the cells and induction of *recA* transcription, irrespective of gyrase or topo IV being the primary target. After inhibition of topo IV with norfloxacin both the induction of the SOS response and the loss of viability were less pronounced than after inhibition with ciprofloxacin, or inhibition of gyrase with both norfloxacin and ciprofloxacin. Loss of viability was also modulated by the rate of cell division as well as growth phase and composition of the growth medium. Resting cultures were not killed by fluoroquinolones, but those with higher affinity to gyrase and topo IV (e.g., moxifloxacin) were more effective in inhibiting the re-growth of such cultures especially if gyrase was the primary target.

Investigation of other inhibitors showed that etoposide, an inhibitor of eucaryotic topoisomerase II, primarily targeted gyrase while rutin primarily targeted topo IV. Both inhibitors induced the SOS response, indicated by filamentation of growing cells, but only etoposide also caused cell death. Furthermore, an *in vitro*-generated quinolone-resistant *E. coli* strain (GyrA^{S83W}) was demonstrated to be hypersensitive to etoposide while the quinolone-sensitive wild-type strain was resistant, thereby confirming former *in vitro* data.

Thus, targeting of topo IV with quinolones or other inhibitors not only differed from that of gyrase with respect to drug interaction, but also to the extent of cellular effects caused by inhibition. The investigations show, that both topo IV and gyrase are promising antibacterial targets for approved and new drug classes even in the face of the growing resistance against fluoroquinolones.

The transcriptional regulation of *parC* and *parE* expression was examined under different physiological conditions with real-time RT-PCR and a newly established fluorescence-based method to map transcription start sites. The latter method revealed for the first time experimentally different start sites dependent upon exponential or stationary growth of a batch culture. DNA sequence alignments of the regions upstream from the transcription start sites of both *parC* and *parE* revealed putative σ^{70} -dependent promoters and putative binding sites for H-NS pointing to a negative transcriptional regulation by a decrease in DNA supercoiling. Such dependence was confirmed for *parC* and to a lesser extent for *parE*. Thus, a temporary relaxation of DNA by cold shock or by inhibition of gyrase with novobiocin caused a significant reduction of *parC* expression. This proof of DNA supercoiling-dependent transcription of *parC* underlines the role of topo IV in maintaining a global degree of negative DNA-supercoiling.

By targeting either gyrase or topo IV, fluoroquinolones did not influence the transcription of *gyrA* or *parE* but in contrast reduced *parC* expression after inhibition of topo IV only.

6 Literatur

1. **Adams, D. E., J. B. Bliska, and N. R. Cozzarelli.** 1992. Cre-lox recombination in *Escherichia coli* cells. Mechanistic differences from the in vitro reaction. *J. Mol. Biol.* **226**:661-673.
2. **Ahmad, S. I.** 1996. A mutant of *Escherichia coli* hyper-resistant to a number of DNA damaging agents: location of the mutational site. *J. Photochem. Photobiol. B.* **36**:47-53.
3. **Ahmad, S. I., S. H. Kirk, and A. Eisenstark.** 1998. Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:591-625.
4. **Anderson, V. E., T. D. Gootz, and N. Osheroff.** 1998. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *J. Biol. Chem.* **273**:17879-17885.
5. **Anderson, V. E., R. P. Zaniewski, F. S. Kaczmarek, T. D. Gootz, and N. Osheroff.** 1999. Quinolones inhibit DNA religation mediated by *Staphylococcus aureus* topoisomerase IV. Changes in drug mechanism across evolutionary boundaries. *J. Biol. Chem.* **274**:35927-35932.
6. **Appleman, J. A., W. Ross, J. Salomon, and R. L. Gourse.** 1998. Activation of *Escherichia coli* rRNA transcription by FIS during a growth cycle. *J. Bacteriol.* **180**:1525-1532.
7. **Applied Biosystems.** Personal Communication. 2002.
8. **Applied Biosystems.** 2002. Protocol: SYBR[®] Green PCR Master Mix and RT-PCR. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.
9. **Arnold, G. F. and I. Tessman.** 1988. Regulation of DNA superhelicity by *rpoB* mutations that suppress defective Rho-mediated transcription termination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:4266-4271.
10. **Arnqvist, A., A. Olsen, and S. Normark.** 1994. Sigma S-dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved in vivo by sigma 70 in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **13**:1021-1032.
11. **Arthur, H. M. and P. B. Eastlake.** 1983. Transcriptional control of the *uvrD* gene of *Escherichia coli*. *Gene* **25**:309-316.
12. **Ashiuchi, M., E. Kuwana, T. Yamamoto, K. Komatsu, K. Soda, and H. Misono.** 2002. Glutamate racemase is an endogenous DNA gyrase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **277**:39070-39073.
13. **Austin, C. A., S. Patel, K. Ono, H. Nakane, and L. M. Fisher.** 1992. Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem. J.* **282**:883-889.
14. **Bagel, S.** 1998. Adhärenzeigenschaften chinolonresistenter *E.coli*-Isolate. Doktorarbeit .
15. **Bagel, S., V. Hullen, 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.
16. **Baird, J. P., T. T. Harkins, S. K. Morris, and J. E. Lindsley.** 1999. Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:13685-13690.
17. **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.
18. **Ball, C. A., R. Osuna, K. C. Ferguson, and R. C. Johnson.** 1992. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:8043-8056.
19. **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.
20. **Baquero, M. R., M. Bouzon, J. Varea, and F. Moreno.** 1995. *sbmC*, a stationary-phase induced SOS *Escherichia coli* gene, whose product protects cells from the DNA replication inhibitor microcin B17. *Mol. Microbiol.* **18**:301-311.
21. **Barnard, F. M. and A. Maxwell.** 2001. Interaction between DNA Gyrase and Quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA Subunit Residues Ser(83) and Asp(87). *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1994-2000.

22. **Barrett-Bee, K., P. Pinder, and J. Stawpert.** 1994. A comparison of the accumulation of novobiocin into bacteria with its antibacterial properties. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**:1041-1045.
23. **Bast, E.** 2001. Lichtmikroskopische Untersuchung von Mikroorganismen, *In* Mikrobiologische Methoden - Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
24. **Belland, R. J., S. G. Morrison, C. Ison, and W. M. Huang.** 1994. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol. Microbiol.* **14**:371-380.
25. **Benbrook, D. M. and R. V. Miller.** 1986. Effects of norfloxacin on DNA metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:1-6.
26. **Bernard, F. X., S. Sable, B. Cameron, J. Provost, J. F. Desnottes, J. Crouzet, and F. Blanche.** 1997. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:992-998.
27. **Bernard, P. and M. Couturier.** 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* **226**:735-745.
28. **Bernard, P., K. E. Kezdy, L. Van Melderen, J. Steyaert, L. Wyns, M. L. Pato, P. N. Higgins, and M. Couturier.** 1993. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.* **234**:534-541.
29. **Bernstein, J. A., A. B. Khodursky, P. H. Lin, S. Lin-Chao, and S. N. Cohen.** 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:9697-9702.
30. **Bertrand-Burggraf, E., P. Oertel, M. Schnarr, M. Daune, and M. Granger-Schnarr.** 1989. Effect of induction of SOS response on expression of pBR322 genes and on plasmid copy number. *Plasmid* **22**:163-168.
31. **Bevington, P. R. and D. K. Robinson.** 1992. Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences. McGraw-Hill, New York.
32. **Birnboim, H. C. and J. Dolly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
33. **Blanche, F., B. Cameron, F. X. Bernard, L. Maton, B. Manse, L. Ferrero, N. Ratet, C. Lecoq, A. Goniot, D. Bisch, and J. Crouzet.** 1996. Differential behaviors of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* type II DNA topoisomerases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2714-2720.
34. **Boege, F., T. Straub, A. Kehr, C. Boesenberg, K. Christiansen, A. Andersen, F. Jakob, and J. Kohrle.** 1996. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **271**:2262-2270.
35. **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.
36. **Boye, E., T. Stokke, N. Kleckner, and K. Skarstad.** 1996. Coordinating DNA replication initiation with cell growth: differential roles for DnaA and SeqA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:12206-12211.
37. **Braga, P. C., M. T. Sala, and M. Dal Sasso.** 1999. Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of rifloxacin on bacterial virulence factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1013-1019.
38. **Brauer-Steppkes, T., C. Josenhans, K. Drlica, and S. Suerbaum.** 1998. DNA-Superhelizität und Regulation der Flagellinexpression bei *Helicobacter pylori*. Abstracts of the 50. Kongress der DGHM, 1998 Berlin, Germany .
39. **Breines, D. M., S. Ouabdesselam, E. Y. Ng, J. Tankovic, S. Shah, C. J. Soussy, and D. C. Hooper.** 1997. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:175-179.

40. **Brendler, T., J. Sawitzke, K. Sergueev, and S. Austin**. 2000. A case for sliding SeqA tracts at anchored replication forks during *Escherichia coli* chromosome replication and segregation. *EMBO J.* **19**:6249-6258.
41. **Brighty, K. E. and T. D. Gootz**. 2000. Chemistry and Mechanism of Action of the Quinolone Antibacterials, p. 33-201. *In* V. T. Andriole (ed.), *The Quinolones*. Academic Press.
42. **Brinkkotter, A., A. Shakeri-Garakani, and J. W. Lengeler**. 2002. Two class II D-tagatose-bisphosphate aldolases from enteric bacteria. *Arch. Microbiol.* **177**:410-419.
43. **Broccoli, S., P. Phoenix, and M. Drolet**. 2000. Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**:58-68.
44. **Brock, T. D.** 1956. Studies on the mode of action of novobiocin. *J. Bacteriol.* **72**:320-323.
45. **Bromberg, K. D., A. B. Burgin, and N. Osheroff**. 2003. Quinolone Action against Human Topoisomerase II α : Stimulation of Enzyme-Mediated Double-Stranded DNA Cleavage. *Biochemistry* **42**:3393-3398.
46. **Brown, P. O. and N. R. Cozzarelli**. 1979. A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA. *Science* **206**:1081-1083.
47. **Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169-193.
48. **Bustin, S. A.** 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**:23-39.
49. **Cairns, J.** 1963. The chromosom of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **28**:43-46.
50. **Camacho-Carranza, R., J. Membrillo-Hernandez, J. Ramirez-Santos, J. Castro-Dorantes, d. S. Chagoya, V, and M. C. Gomez-Eichelmann**. 1995. Topoisomerase activity during the heat shock response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **177**:3619-3622.
51. **Capranico, G. and M. Binaschi**. 1998. DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim. Biophys. Acta* **1400**:185-194.
52. **Champoux, J. J.** 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:369-413.
53. **Charbonnier, F. and P. Forterre**. 1994. Comparison of plasmid DNA topology among mesophilic and thermophilic eubacteria and archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **176**:1251-1259.
54. **Charollais, J., D. Pflieger, J. Vinh, M. Dreyfus, and I. Iost** 2003. The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**:1253-1265.
55. **Chatterji, M. and V. Nagaraja**. 2002. Gyrl: a counter-defensive strategy against proteinaceous inhibitors of DNA gyrase. *EMBO Rep.* **3**:261-267.
56. **Chatterji, M., S. Sengupta, and V. Nagaraja**. 2003. Chromosomally encoded gyrase inhibitor Gyrl protects *Escherichia coli* against DNA-damaging agents. *Arch. Microbiol.* **180**:339-346.
57. **Chatterji, M., S. Unniraman, A. Maxwell, and V. Nagaraja**. 2000. The additional 165 amino acids in the B protein of *Escherichia coli* DNA gyrase have an important role in DNA binding. *J. Biol. Chem.* **275**:22888-22894.
58. **Chen, A. Y. and L. F. Liu**. 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**:191-218.
59. **Chen, C. C. and H. Y. Wu**. 2003. Transcription-driven DNA supercoiling and gene expression control. *Front. Biosci.* **8**:430-439.
60. **Chen, C. R., M. Malik, M. Snyder, and K. Drlica**. 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone- induced DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* **258**:627-637.
61. **Chen, D., R. Bowater, and D. M. Lilley**. 1994. Topological promoter coupling in *Escherichia coli*: delta *topA*-dependent activation of the leu-500 promoter on a plasmid. *J. Bacteriol.* **176**:3757-3764.

62. **Chin, N. X. and H. C. Neu.** 1983. In vitro activity of enoxacin, a quinolone carboxylic acid, compared with those of norfloxacin, new beta-lactams, aminoglycosides, and trimethoprim. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**:754-763.
63. **Choi, H., H. J. Lee, and Y. Lee.** 1998. A mutation in QRDR in the ParC subunit of topoisomerase IV was responsible for fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Yonsei Med. J.* **39**:541-545.
64. **Churchward, G., H. Bremer, and R. Young.** 1982. Transcription in bacteria at different DNA concentrations. *J. Bacteriol.* **150**:572-581.
65. **Cohen, S. N., A. C. Chang, and L. Hsu.** 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:2110-2114.
66. **Collado-Vides, J., B. Magasanik, and J. D. Gralla.** 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* **55**:371-394.
67. **Confalonieri, F., C. Elie, M. Nadal, T. C. de La, P. Forterre, and M. Duguet.** 1993. Reverse gyrase: a helicase-like domain and a type I topoisomerase in the same polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4753-4757.
68. **Contreras, A. and A. Maxwell.** 1992. *gyrB* mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **6**:1617-1624.
69. **Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown, and P. C. Hanawalt .** 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**:41-64.
70. **Cox, M. M.** 2001. Recombinational DNA repair of damaged replication forks in *Escherichia coli*: questions. *Annu. Rev. Genet.* **35**:53-82.
71. **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.
72. **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. B)**:9-23.
73. **de Vries, T. J., A. Fourkour, C. J. Punt, L. T. van de Locht, T. Wobbes, B. S. van den, M. J. de Rooij, E. J. Mensink, D. J. Ruiter, and G. N. van Muijen.** 1999. Reproducibility of detection of tyrosinase and MART-1 transcripts in the peripheral blood of melanoma patients: a quality control study using real-time quantitative RT-PCR. *Br. J. Cancer* **80**:883-891.
74. **Deibler, R. W., S. Rahmati, and E. L. Zechiedrich.** 2001. Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*. *Genes Dev.* **15**:748-761.
75. **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.
76. **del Castillo, I., J. L. Vizan, M. C. Rodriguez-Sainz, and F. Moreno.** 1991. An unusual mechanism for resistance to the antibiotic coumermycin A1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:8860-8864.
77. **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.
78. **DiGate, R. J. and K. J. Marians.** 1988. Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**:13366-13373.
79. **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.
80. **Doublet, P., J. van Heijenoort, and D. Mengin-Lecreulx.** 1996. Regulation of the glutamate racemase of *Escherichia coli* investigated by site-directed mutagenesis. *Microb. Drug Resist.* **2**:43-49.

81. **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.
82. **Drlica, K.** 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* **6**:425-433.
83. **Drlica, K. and M. Snyder.** 1978. Superhelical *Escherichia coli* DNA: relaxation by coumermycin. *J. Mol. Biol.* **120**:145-154.
84. **Drlica, K., C. Xu, J. Y. Wang, R. M. Burger, and M. Malik.** 1996. Fluoroquinolone action in mycobacteria: similarity with effects in *Escherichia coli* and detection by cell lysate viscosity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1594-1599.
85. **Drlica, K. and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:377-392.
86. **Duguid, I. G., E. Evans, M. R. Brown, and P. Gilbert.** 1992. Growth-rate-independent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**:791-802.
87. **Duwe, A. K., C. A. Rupar, G. B. Horsman, and S. I. Vas.** 1986. In vitro cytotoxicity and antibiotic activity of polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**:340-341.
88. **Ebright, R. H.** 1993. Transcription activation at Class I CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **8**:797-802.
89. **el Amin, N. A., S. Jalal, and B. Wretlind.** 1999. Alterations in GyrA and ParC associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:947-949.
90. **Elkins, C. A. and H. Nikaido.** 2002. Substrate 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.
91. **Elliott, T. S., A. Shelton, and D. Greenwood.** 1987. The response of *Escherichia coli* to ciprofloxacin and norfloxacin. *J. Med. Microbiol.* **23**:83-88.
92. **Engle, E. C., S. H. Manes, and K. Drlica.** 1982. Differential effects of antibiotics inhibiting gyrase. *J. Bacteriol.* **149**:92-98.
93. **Espeli, O., C. Lee, and K. J. Marians.** 2003. A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* **278**:44639-44644.
94. **Etchegaray, J. P. and M. Inouye.** 1999. CspA, CspB, and CspG, major cold shock proteins of *Escherichia coli*, are induced at low temperature under conditions that completely block protein synthesis. *J. Bacteriol.* **181**:1827-1830.
95. **Fang, M. and H. Y. Wu.** 1998. A Promoter Relay Mechanism for Sequential Gene Activation. *J. Bacteriol.* **180**:626-633.
96. **Fath, M. J. and R. Kolter.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**:995-1017.
97. **Fernandes, P. B., R. Menzel, D. J. Hardy, Y. C. Tse-Dinh, A. Warren, and D. A. Elsemore.** 1999. Microbial resistance: novel screens for a contemporary problem. *Med. Res. Rev.* **19**:559-568.
98. **Ferrero, L., B. Cameron, and J. Crouzet.** 1995. Analysis of *gyrA* and *griA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1554-1558.
99. **Ferré, F., A. Marchese, P. Pezzoli, S. Griffin, E. Buxton, and V. Boyer.** 1994. Quantitative PCR - An overview, p. 67-88. *In* K. B. Mullis, F. Ferré, and R. A. Gibbs (eds.), *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhauser, Cambridge, MA.
100. **Forsberg, A. J., G. D. Pavitt, and C. F. Higgins.** 1994. Use of transcriptional fusions to monitor gene expression: a cautionary tale. *J. Bacteriol.* **176**:2128-2132.
101. **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.

102. **Franco, R. J. and K. Drlica.** 1989. Gyrase inhibitors can increase *gyrA* expression and DNA supercoiling. *J. Bacteriol.* **171**:6573-6579.
103. **Frenkel, L. and H. Bremer.** 1986. Increased amplification of plasmids pBR322 and pBR327 by low concentrations of chloramphenicol. *DNA* **5**:539-544.
104. **Freudenreich, C. H. and K. N. Kreuzer.** 1994. Localization of an aminoacridine antitumor agent in a type II topoisomerase-DNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11007-11011.
105. **Friedman, S. M., T. Lu, and K. Drlica.** 2001. Mutation in the DNA Gyrase A Gene of *Escherichia coli* That Expands the Quinolone Resistance-Determining Region. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2378-2380.
106. **Frishman, D., A. Mironov, H. W. Mewes, and M. Gelfand.** 1998. Combining diverse evidence for gene recognition in completely sequenced bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **26**:2941-2947.
107. **Froelich-Ammon, S. J. and N. Osheroff.** 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J. Biol. Chem.* **270**:21429-21432.
108. **Funnell, B. E., T. A. Baker, and A. Kornberg.** 1987. In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **262**:10327-10334.
109. **Gamper, H. B. and J. E. Hearst.** 1982. A topological model for transcription based on unwinding angle analysis of *E. coli* RNA polymerase binary, initiation and ternary complexes. *Cell* **29**:81-90.
110. **Gari, E., N. Figueroa-Bossi, A. B. Blanc-Potard, F. Spirito, M. B. Schmid, and L. Bossi.** 1996. A class of gyrase mutants of *Salmonella typhimurium* show quinolone-like lethality and require rec functions for viability. *Mol. Microbiol.* **21**:111-122.
111. **Gari, E., L. Bossi, and N. Figueroa-Bossi.** 2001. Growth-Dependent DNA Breakage and Cell Death in a Gyrase Mutant of Salmonella. *Genetics* **159**:1405-1414.
112. **Garrido, M. C., M. Herrero, R. Kolter, and F. Moreno.** 1988. The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* **7**:1853-1862.
113. **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.
114. **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.
115. **Gellert, M., M. H. O'Dea, T. Itoh, and J. Tomizawa.** 1976. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:4474-4478.
116. **Germond, J. E., B. Hirt, P. Oudet, M. Gross-Bellark, and P. Chambon.** 1975. Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:1843-1847.
117. **Gmuender, H., K. Kuratli, K. Di Padova, C. P. Gray, W. Keck, and S. Evers.** 2001. Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis. *Genome Res.* **11**:28-42.
118. **Gomez-Gomez, J. M., F. Baquero, and J. Blazquez.** 1996. Cyclic AMP receptor protein positively controls *gyrA* transcription and alters DNA topology after nutritional upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:3331-3334.
119. **Goss, W. A., W. H. Deitz, and T. M. Cook.** 1964. Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli* (I). *J. Bacteriol.* **88**:1112-1118.
120. **Goss, W. A., W. H. Deitz, and T. M. Cook.** 1965. Mechanism of Action of Nalidixic Acid on *Escherichia coli* (II). Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis. *J. Bacteriol.* **89**:1068-1074.
121. **Gosset, W. S.** 1908. The probable error of a mean. *Biometrika* **6**:1-25.
122. **Gradelski, E., B. Kolek, D. Bonner, and J. Fung-Tomc.** 2002. Bactericidal mechanism of gatifloxacin compared with other quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:185-188.
123. **Grompone, G., S. D. Ehrlich, and B. Michel.** 2003. Replication restart in *gyrB* *Escherichia coli* mutants. *Mol. Microbiol.* **48**:845-854.

124. **Gross, C. A., M. Lonetto, and R. Losick.** 1992. Bacterial sigma factors, p. 129-176. In S. McKnight and Yamamoto (eds.), *Transcriptional Regulation*. CSHL Press.
125. **Gross, C. H., J. D. Parsons, T. H. Grossman, P. S. Charifson, S. Bellon, J. Jernee, M. Dwyer, S. P. Chambers, W. Markland, M. Botfield, and S. A. Raybuck.** 2003. Active-site residues of *Escherichia coli* DNA gyrase required in coupling ATP hydrolysis to DNA supercoiling and amino acid substitutions leading to novobiocin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1037-1046.
126. **Grunberg-Manago, M.** 1999. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev. Genet.* **33**:193-227.
127. **Grüger, T., J. L. Nitiss, A. Maxwell, E. L. Zechiedrich, P. Heisig, S. Seeber, Y. Pommier, and D. Strumberg.** 2004. A mutation in *E. coli* DNA gyrase conferring quinolone resistance results in sensitivity to drugs targeting eucaryotic topoisomerase II. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4495-4504.
128. **Hamilton, C. M., M. Aldea, B. K. Washburn, P. Babitzke, and S. R. Kushner.** 1989. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:4617-4622.
129. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
130. **Hardy, C. D. and N. R. Cozzarelli.** 2003. Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:941-947.
131. **Harley, C. B. and R. P. Reynolds.** 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**:2343-2361.
132. **Heaton, V. J., J. E. Ambler, and L. M. Fisher.** 2000. Potent antipneumococcal activity of gemifloxacin is associated with dual targeting of gyrase and topoisomerase IV, an in vivo target preference for gyrase, and enhanced stabilization of cleavable complexes in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3112-3117.
133. **Heddle, J. and A. Maxwell.** 2002. Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1805-1815.
134. **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.
135. **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.
136. **Heisig, P., H. Schedletzky, and H. Falkenstein-Paul.** 1993. Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:696-701.
137. **Heisig, P. and R. Tschorny.** 1994. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1284-1291.
138. **Heisig, P. and B. Wiedemann.** 1991. Use of a broad-host-range *gyrA* plasmid for genetic characterization of fluoroquinolone-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:2031-2036.
139. **Helmann, J. D. and M. J. Chamberlin.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:839-872.
140. **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.
141. **Hertz, G. Z. and G. D. Stormo.** 1996. *Escherichia coli* promoter sequences: analysis and prediction. *Methods Enzymol.* **273**:30-42.
142. **Hiasa, H. and K. J. Marians.** 1996. Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J. Biol. Chem.* **271**:21529-21535.
143. **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.

144. **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.
145. **Higgins, C. F., J. C. Hinton, C. S. Hulton, T. Owen-Hughes, G. D. Pavitt, and A. Seirafi.** 1990. Protein H1: a role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence? *Mol. Microbiol.* **4**:2007-2012.
146. **Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y.)* **10**:413-417.
147. **Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson.** 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* **11** :1026-1030.
148. **Hilliard, J. J., H. M. Krause, J. I. Bernstein, J. A. Fernandez, V. Nguyen, K. A. Ohemeng, and J. F. Barrett.** 1995. A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **390**:59-69.
149. **Ho, H., G. A. Warr, B. M. Ryan, C. E. Mazzucco, M. Frosco, L. E. Lawrence, and J. F. Barrett.** 2000. A Comparison of the Inhibitory Activity of BMS-284756 on the DNA, RNA and Protein Biosynthesis as well as Kill Rate in Mithicillin-Sensitive and Mithicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. Abstract 754, 40th ICAAC, Toronto, Canada.
150. **Hojgaard, A., H. Szerlong, C. Tabor, and P. Kuempel.** 1999. Norfloxacin-induced DNA cleavage occurs at the dif resolvase locus in *Escherichia coli* and is the result of interaction with topoisomerase IV. *Mol. Microbiol.* **33**:1027-1036.
151. **Holden, J. A.** 2001. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. *Curr. Med. Chem. Anti.-Canc. Agents* **1**:1-25.
152. **Holmes, V. F. and N. R. Cozzarelli.** 2000. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:1322-1324.
153. **Hooper, D. C.** 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* **31(Suppl 2)**:24-28.
154. **Hooper, D. C. and J. S. Wolfson (eds).** 1993. Mechanisms of quinolone action and bacterial killing, *In* Quinolone Antibacterial Agents 2nd Edition p. 53-75., ASM Press, Washington D.C.
155. **Horiuchi, T. and Y. Fujimura.** 1995. Recombinational rescue of the stalled DNA replication fork: a model based on analysis of an *Escherichia coli* strain with a chromosome region difficult to replicate. *J. Bacteriol.* **177**:783-791.
156. **Howard, B. M., R. J. Pinney, and J. T. Smith.** 1993. 4-Quinolone bactericidal mechanisms. *Arzneimittelforschung.* **43**:1125-1129.
157. **Howard, B. M., R. J. Pinney, and J. T. Smith.** 1993. Function of the SOS process in repair of DNA damage induced by modern 4- quinolones. *J. Pharm. Pharmacol.* **45** :658-662.
158. **Hsieh, L. S., R. M. Burger, and K. Drlica.** 1991. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP]. Changes associated with a transition to anaerobic growth. *J. Mol. Biol.* **219**:443-450.
159. **Hsieh, L. S., J. Rouviere-Yaniv, and K. Drlica.** 1991. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] ratio: changes associated with salt shock. *J. Bacteriol.* **173**:3914-3917.
160. **Hsiung, Y., S. H. Elsea, N. Osheroff, and J. L. Nitiss.** 1995. A mutation in yeast TOP2 homologous to a quinolone-resistant mutation in bacteria. Mutation of the amino acid homologous to Ser83 of *Escherichia coli gyrA* alters sensitivity to eukaryotic topoisomerase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **270**:20359-20364.
161. **Huang, W. M., J. L. Libbey, H. P. van der, and S. X. Yu .** 1998. Bipolar localization of *Bacillus subtilis* topoisomerase IV, an enzyme required for chromosome segregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:4652-4657.
162. **Huisman, G. W., D. A. Siegele, M. M. Zambrano, and R. Kolter.** 1996. Morphological and physiological changes during stationary phase, p. 1672-1682. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology.* ASM Press, Washington, DC.

163. **Hulton, C. S., A. Seirafi, J. C. Hinton, J. M. Sidebotham, L. Waddell, G. D. Pavitt, T. Owen-Hughes, A. Spassky, H. Buc, and C. F. Higgins.** 1990. Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell* **63**:631-642.
164. **Hüllen, V.** 1994. Bedeutung der Aminosäuren Serin83 und Aspartat87 in der A-Untereinheit der Gyrase von *E. coli* für die Empfindlichkeit gegenüber 4-Chinolonen. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
165. **Iost, I. and M. Dreyfus.** 1994. mRNAs can be stabilized by DEAD-box proteins. *Nature* **372**:193-196.
166. **Ishida, R., M. Hamatake, R. A. Wasserman, J. L. Nitiss, J. C. Wang, and T. Andoh.** 1995. DNA topoisomerase II is the molecular target of bisdioxopiperazine derivatives ICRF-159 and ICRF-193 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.* **55**:2299-2303.
167. **Ishihama, A.** 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:499-518.
168. **Jaffe, A., T. Ogura, and S. Hiraga.** 1985. Effects of the ccd function of the F plasmid on bacterial growth. *J. Bacteriol.* **163**:841-849.
169. **Janion, C., A. Sikora, A. Nowosielska, and E. Grzesiuk.** 2002. Induction of the SOS response in starved *Escherichia coli*. *Environ. Mol. Mutagen.* **40**:129-133.
170. **Jaworski, A., N. P. Higgins, R. D. Wells, and W. Zacharias.** 1991. Topoisomerase mutants and physiological conditions control supercoiling and Z-DNA formation in vivo. *J. Biol. Chem.* **266**:2576-2581.
171. **Jensen, R. B., E. Grohmann, H. Schwab, R. Diaz-Orejas, and K. Gerdes.** 1995. Comparison of ccd of F, parDE of RP4, and parD of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1. *Mol. Microbiol.* **17**:211-220.
172. **Jiang, Y., J. Pogliano, D. R. Helinski, and I. Konieczny.** 2002. ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. *Mol. Microbiol.* **44**:971-979.
173. **Jones, P. G., R. Krah, S. R. Tafuri, and A. P. Wolffe.** 1992. DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:5798-5802.
174. **Kampranis, S. C., N. A. Gormley, R. Tranter, G. Orphanides, and A. Maxwell.** 1999. Probing the binding of coumarins and cyclothialidines to DNA gyrase. *Biochemistry* **38**:1967-1976.
175. **Kaneko, T., T. Mizushima, Y. Ohtsuka, K. Kurokawa, K. Kataoka, T. Miki, and K. Sekimizu.** 1996. Co-induction of DNA relaxation and synthesis of DnaK and GroEL proteins in *Escherichia coli* by expression of LetD (CcdB) protein, an inhibitor of DNA gyrase encoded by the F factor. *Mol. Gen. Genet.* **250**:593-600.
176. **Kang, S., J. S. Han, J. H. Park, K. Skarstad, and D. S. Hwang.** 2003. SeqA protein stimulates the relaxing and decatenating activities of topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* **278**:48779-48785.
177. **Karem, K. and J. W. Foster.** 1993. The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **10**:75-86.
178. **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.
179. **Kato, J., Y. Nishimura, M. Yamada, H. Suzuki, and Y. Hirota.** 1988. Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:3967-3977.
180. **Kenyon, C. J. and G. C. Walker.** 1980. DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:2819-2823.
181. **Kern, W. V., M. Oethinger, A. S. Jellen-Ritter, and S. B. Levy.** 2000. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:814-820.
182. **Khodursky, A. B. and N. R. Cozzarelli.** 1998. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* **273**:27668-27677.

183. **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 replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:9419-9424.
184. **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.
185. **Kingma, P. S. and N. Osheroff.** 1997. Apurinic sites are position-specific topoisomerase II poisons. *J. Biol. Chem.* **272**:1148-1155.
186. **Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garges, and S. Adhya.** 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:749-795.
187. **Kolter, R. and F. Moreno.** 1992. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:141-163.
188. **Körber, B., E. Luhmer, H.-J.Linde, N. Lehn, and P. Heisg.** 2001. Bactericidal mechanisms of moxifloxacin against defined topoisomerase mutants of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **47(Suppl. 1)**: 21.
189. **Krasin, F. and F. Hutchinson.** 1977. Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*, which requires *recA* function and the presence of a duplicate genome. *J. Mol. Biol.* **116**:81-98.
190. **Kreuzer, K. N. and N. R. Cozzarelli.** 1979. *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J. Bacteriol.* **140**:424-435.
191. **Krueger, J. H. and G. C. Walker.** 1984. *groEL* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an *htpR*⁺-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1499-1503.
192. **Kubo, T., K. Kohno, T. Ohga, K. Taniguchi, K. Kawanami, M. Wada, and M. Kuwano.** 1995. DNA topoisomerase II alpha gene expression under transcriptional control in etoposide/teniposide-resistant human cancer cells. *Cancer Res.* **55**:3860-3864.
193. **Kurokawa, K., T. Mizushima, T. Miki, and K. Sekimizu .** 1996. Influence of the linking number of template DNA on σ^{32} -dependent transcription initiation in vitro of the *Escherichia coli groE* gene. *Biol. Pharm. Bull.* **19**:922-925.
194. **Kusano, S., Q. Ding, N. Fujita, and A. Ishihama.** 1996. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. *J. Biol. Chem.* **271**:1998-2004.
195. **Lange, R. and R. Hengge-Aronis.** 1991. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:49-59.
196. **Lecomte, S., M. H. Baron, M. T. Chenon, C. Coupry, and N. J. Moreau.** 1994. Effect of magnesium complexation by fluoroquinolones on their antibacterial properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2810-2816.
197. **Lehn, N., J. Stower-Hoffmann, T. Kott, C. Strassner, H. Wagner, M. Kronke, and W. Schneider-Brachert.** 1996. Characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* showing high levels of fluoroquinolone resistance. *J. Clin. Microbiol.* **34**:597-602.
198. **Lesley, S. A., S. B. Jovanovich, Y. C. Tse-Dinh, and R. R. Burgess.** 1990. Identification of a heat shock promoter in the *topA* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6871-6874.
199. **Lewin, C. S., S. G. Amyes, and J. T. Smith.** 1989. Bactericidal activity of enoxacin and lomefloxacin against *Escherichia coli* KL16. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**:731-733.
200. **Lewin, C. S., P. Blakemore, Y. J. Drabu, and J. T. Smith.** 1990. Loss of ciprofloxacin's second killing action in *Escherichia coli* that have developed 4-quinolone resistance during therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **26**:594-596.
201. **Lewin, C. S., B. M. Howard, and J. T. Smith.** 1991. Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. *J. Med. Microbiol.* **34**:19-22.
202. **Li, S. and R. Waters.** 1998. *Escherichia coli* Strains Lacking Protein HU Are UV Sensitive due to a Role for HU in Homologous Recombination. *J. Bacteriol.* **180**:3750-3756.

203. **Li, T. K. and L. F. Liu.** 1998. Modulation of gyrase-mediated DNA cleavage and cell killing by ATP. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1022-1027.
204. **Liang, S. T., Y. C. Xu, P. Dennis, and H. Bremer.** 2000. mRNA composition and control of bacterial gene expression. *J. Bacteriol.* **182**:3037-3044.
205. **Lindsley, J. E. and J. C. Wang.** 1993. On the coupling between ATP usage and DNA transport by yeast DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* **268**:8096-8104.
206. **Little, J. W. and D. W. Mount.** 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**:11-22.
207. **Liu, L. F.** 1989. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:351-375.
208. **Liu, L. F. and J. C. Wang.** 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:7024-7027.
209. **Lomovskaya, O., M. S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberland, T. Renau, R. Leger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, H. Ishida, and V. J. Lee.** 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:105-116.
210. **Lonetto, M. A., K. L. Brown, K. E. Rudd, and M. J. Buttner.** 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:7573-7577.
211. **Lopez-Garcia, P. and P. Forterre.** 1999. Control of DNA topology during thermal stress in hyperthermophilic archaea: DNA topoisomerase levels, activities and induced thermotolerance during heat and cold shock in *Sulfolobus*. *Mol. Microbiol.* **33**:766-777.
212. **Lu, T., X. Zhao, and K. Drlica.** 1999. Gatifloxacin activity against quinolone-resistant gyrase: allele-specific enhancement of bacteriostatic and bactericidal activities by the C-8-methoxy group. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2969-2974.
213. **Macinga, D. R., P. J. Renick, K. M. Makin, D. H. Ellis, A. A. Kreiner, M. Li, K. J. Rupnik, E. M. Kincaid, C. D. Wallace, B. Ledoussal, and T. W. Morris.** 2003. Unique biological properties and molecular mechanism of 5,6-bridged quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2526-2537.
214. **Maeda, H., N. Fujita, and A. Ishihama.** 2000. Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **28**:3497-3503.
215. **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbour, New York.
216. **Marians, K. J. and H. Hiasa.** 1997. Mechanism of quinolone action. A drug-induced structural perturbation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* **272**:9401-9409.
217. **Marians, K. J., J. S. Minden, and C. Parada.** 1986. Replication of superhelical DNAs in vitro. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **33**:111-140.
218. **Mason, D. J., E. G. Power, H. Talsania, I. Phillips, and V. A. Gant.** 1995. Antibacterial action of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2752-2758.
219. **Masse, E. and M. Drolet.** 1999. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J. Biol. Chem.* **274**:16659-16664.
220. **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.
221. **Matsushiro, A., K. Sato, H. Miyamoto, T. Yamamura, and T. Honda.** 1999. Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. *J. Bacteriol.* **181**:2257-2260.
222. **Maxwell, A.** 1992. The molecular basis of quinolone action. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**:409-414.

223. **Maxwell, A.** 1993. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Mol. Microbiol.* **9**:681-686.
224. **Mazzariol, A., Y. Tokue, T. M. Kanegawa, G. Cornaglia, and H. Nikaido.** 2000. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3441-3443.
225. **McCoy, E. C., L. A. Petrullo, and H. S. Rosenkranz.** 1980. Non-mutagenic genotoxicants: novobiocin and nalidixic acid, 2 inhibitors of DNA gyrase. *Mutat. Res.* **79**:33-43.
226. **McCullough, J. E., M. T. Muller, A. J. Howells, A. Maxwell, J. O'Sullivan, R. S. Summerill, W. L. Parker, J. S. Wells, D. P. Bonner, and P. B. Fernandes.** 1993. Clerocidin, a terpenoid antibiotic, inhibits bacterial DNA gyrase. *J. Antibiot.(Tokyo)* **46**:526-530.
227. **McKeegan, K. S., M. I. Borges-Walmsley, and A. R. Walmsley.** 2002. Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends Microbiol.* **10**:8-14.
228. **Menzel, R.** 1989. A microtiter plate-based system for the semiautomated growth and assay of bacterial cells for beta-galactosidase activity. *Anal. Biochem.* **181**:40-50.
229. **Menzel, R. and M. Gellert.** 1983. Regulation of the genes for *E. coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* **34**:105-113.
230. **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.
231. **Messer, W. and C. Weigel.** 1996. Initiation of chromosome replication, p. 1579-1601. In F.C.Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, DC.
232. **Miller, W. G. and R. W. Simons.** 1993. Chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **10**:675-684.
233. **Mizuuchi, K., M. Gellert, and H. A. Nash.** 1978. Involvement of supertwisted DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* **121**:375-392.
234. **Montero, C., G. Mateu, R. Rodriguez, and H. Takiff.** 2001. Intrinsic Resistance of *Mycobacterium smegmatis* to Fluoroquinolones May Be Influenced by New Pentapeptide Protein MfpA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:3387-3392.
235. **Mossesso, E., C. Levine, H. Peng, P. Nurse, S. Bahng, and K. J. Mariani.** 2000. Mutational Analysis of *Escherichia coli* Topoisomerase IV. I. Selection of Dominant-negative *parE* Alleles. *J. Biol. Chem.* **275**:4099-4103.
236. **Movva, R. N., P. Green, K. Nakamura, and M. Inouye.** 1981. Interaction of cAMP receptor protein with the *ompA* gene, a gene for a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **128**:186-190.
237. **Muller, P. Y., H. Janovjak, A. R. Miserez, and Z. Dobbie.** 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* **32**:1372-1379.
238. **Munoz-Bellido, J. L., M. M. Alonzo, J. A. Martinez Andres, M. N. Gutierrez Zufiaurre, G. Ortiz, H. M. Segovia, and J. A. Garcia-Rodriguez.** 1999. Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *griA*, and *norA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:354-356.
239. **Naber, K. G., D. Adam, and Expertengruppe der Paul-Ehrlich-Gesellschaft.** 1998. Einteilung der Fluorchinolone. *Chemotherapie Journal* **7**:66-68.
240. **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.
241. **Nakada, N., H. Gmunder, T. Hirata, and M. Arisawa.** 1995. Characterization of the binding site for cyclothialidine on the B subunit of DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* **270**:14286-14291.
242. **Nakanishi, A., T. Oshida, T. Matsushita, S. Imajoh-Ohmi, and T. Ohnuki.** 1998. Identification of DNA gyrase inhibitor (Gyrl) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **273**:1933-1938.

243. **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.
244. **Neu, H. C., A. Novelli, and N. X. Chin.** 1989. Comparative in vitro activity of a new quinolone, AM-1091. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1036-1041.
245. **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.
246. **Niki, H., A. Jaffe, R. Imamura, T. Ogura, and S. Hiraga .** 1991. The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J.* **10**:183-193.
247. **Noble, C. G., F. M. Barnard, and A. Maxwell.** 2003. Quinolone-DNA interaction: sequence-dependent binding to single-stranded DNA reflects the interaction within the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:854-862.
248. **Nogueira, T. and M. Springer.** 2000. Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol* **3**:154-158.
249. **Nurse, P., S. Bahng, E. Mossessova, and K. J. Marians.** 2000. Mutational Analysis of *Escherichia coli* Topoisomerase IV. II. ATPase Negative Mutants of ParE Induce Hyper-DNA Cleavage. *J. Biol. Chem.* **275**:4104-4111.
250. **O'Neill, M. C.** 1989. *Escherichia coli* promoters. I. Consensus as it relates to spacing class, specificity, repeat substructure, and three-dimensional organization. *J. Biol. Chem.* **264**:5522-5530.
251. **Oethinger, M., W. V. Kern, A. S. Jellen-Ritter, L. M. McMurry, and S. B. Levy.** 2000. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:10-13.
252. **Ogretmen, B., H. Ratajczak, A. Kats, B. C. Stark, and S. M. Gendel .** 1993. Effects of staining of RNA with ethidium bromide before electrophoresis on performance of northern blots. *Biotechniques* **14**:932-935.
253. **Oh, T. J., I. L. Jung, and I. G. Kim.** 2001. The *Escherichia coli* SOS gene *sbmC* is regulated by H-NS and RpoS during the SOS induction and stationary growth phase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**:1052-1058.
254. **Oh, T. J. and I. G. Kim.** 1999. Identification of genetic factors altering the SOS induction of DNA damage-inducible *yebG* gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**:271-277.
255. **Oh, T. J., C. W. Lee, and I. G. Kim.** 1999. The damage-inducible (*din*) genes of *Escherichia coli* are induced by various genotoxins in a different way. *Microbiol. Res.* **154**:179-183.
256. **Ohemeng, K. A., C. F. Schwender, K. P. Fu, and J. F. Barrett.** 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **3**:225-230.
257. **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.
258. **Oram, M., B. Dosanjh, N. A. Gormley, C. V. Smith, L. M. Fisher, A. Maxwell, and K. Duncan** 1996. Mode of action of GR122222X, a novel inhibitor of bacterial DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:473-476.
259. **Oram, M., A. J. Howells, A. Maxwell, and M. L. Pato.** 2003. A biochemical analysis of the interaction of DNA gyrase with the bacteriophage Mu, pSC101 and pBR322 strong gyrase sites: the role of DNA sequence in modulating gyrase supercoiling and biological activity. *Mol. Microbiol.* **50**:333-347.
260. **Osborne, M. S., W. M. Maiese, and M. Greenstein.** 1990. In vitro inhibition of bacterial DNA gyrase by cinodine, a glycocinnamoylspermidine antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1450-1452.
261. **Park, J. Y. and B. Ahn.** 2000. Effect of DNA topology on plasmid DNA repair in vivo. *FEBS Lett.* **476**:174-178.

262. **Peccoud, J. and C. Jacob.** 1996. Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys. J.* **71**:101-108.
263. **Peng, H. and K. J. Marians.** 1993. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J. Biol. Chem.* **268**:24481-24490.
264. **Peng, H. and K. J. Marians.** 1995. The interaction of *Escherichia coli* topoisomerase IV with DNA. *J. Biol. Chem.* **270**:25286-25290.
265. **Perez-Martin, J. and V. de Lorenzo.** 1997. Clues and consequences of DNA bending in transcription. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:593-628.
266. **Perichon, B., J. Tankovic, and P. Courvalin.** 1997. Characterization of a mutation in the *parE* gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1166-1167.
267. **Peter, B. J., C. Ullsperger, H. Hiasa, K. J. Marians, and N. R. Cozzarelli.** 1998. The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* **94**:819-827.
268. **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.
269. **Piddock, L. J., M. C. Hall, and R. Wise.** 1990. Mechanism of action of lomefloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1088-1093.
270. **Piddock, L. J., R. N. Walters, and J. M. Diver.** 1990. Correlation of quinolone MIC and inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis and induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:2331-2336.
271. **Pommier, Y., D. Kerrigan, R. E. Schwartz, J. A. Swack, and A. McCurdy.** 1986. Altered DNA topoisomerase II activity in Chinese hamster cells resistant to topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res.* **46**:3075-3081.
272. **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.
273. **Pruss, G. J. and K. Drlica.** 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**:521-523.
274. **Qi, H., R. Menzel, and Y. C. Tse-Dinh.** 1996. Effect of the deletion of the sigma 32-dependent promoter (P1) of the *Escherichia coli* topoisomerase I gene on thermotolerance. *Mol. Microbiol.* **21**:703-711.
275. **Qi, H., R. Menzel, and Y. C. Tse-Dinh.** 1997. Regulation of *Escherichia coli topA* gene transcription: involvement of a sigmaS-dependent promoter. *J. Mol. Biol.* **267**:481-489.
276. **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.
277. **Rajkumari, K., S. Kusano, A. Ishihama, T. Mizuno, and J. Gowrishankar.** 1996. Effects of H-NS and potassium glutamate on sigmaS- and sigma70-directed transcription in vitro from osmotically regulated P1 and P2 promoters of proU in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:4176-4181.
278. **Ramon, M. S., E. Canton, J. Peman, A. Pastor, and J. P. Martinez.** 1999. Mechanisms of action of quinolones against staphylococci and relationship with their in vitro bactericidal activity. *Chemotherapy* **45**:175-182.
279. **Ratcliffe, N. T. and J.T. Smith.** 1984. Ciprofloxacin and Ofloxacin exhibit a Rifampicin-Resistant Bactericidal Mechanism of Detectable in other 4-Quinolone Antibacterial Agents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **36(Suppl.)**:59P.
280. **Ratcliffe, N. T. and J.T. Smith.** 1985. Norfloxacin has a novel Bactericidal Mechanism unrelated to that of other 4-Quinolones. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **37(Suppl.)**:92P.
281. **Reeve, C. A., P. S. Amy, and A. Matin.** 1984. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **160**:1041-1046.
282. **Richardson, S. M., C. F. Higgins, and D. M. Lilley.** 1988. DNA supercoiling and the leu-500 promoter mutation of *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* **7**:1863-1869.

283. **Roberts, I.** 1998. Gene Expression and Analysis. *Methods in Microbiology* **27**:467-483.
284. **Roth, F. P., J. D. Hughes, P. W. Estep, and G. M. Church.** 1998. Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation. *Nat. Biotechnol.* **16**:939-945.
285. **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.
286. **Salgado, H., A. Santos-Zavaleta, S. Gama-Castro, D. Millan-Zarate, F. R. Blattner, and J. Collado-Vides.** 2000. RegulonDB (version 3.0): transcriptional regulation and operon organization in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **28**:65-67.
287. **Sanchez, M. S. and J. L. Watts.** 1999. Enhancement of the activity of novobiocin against *Escherichia coli* by lactoferrin. *J. Dairy Sci.* **82**:494-499.
288. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
289. **Sawitzke, J. A. and S. J. Austin.** 2000. Suppression of chromosome segregation defects of *Escherichia coli* *muk* mutants by mutations in topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:1671-1676.
290. **Schedletzky, H.** 1998. Einfluß von Mutationen auf die Enzymaktivität von Typ-II Topoisomerasen von *E. coli*. Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
291. **Schedletzky, H. and B. Wiedeman.** 1993. Stabilität von ternären Komplexen aus Gyrase-DNA und 4-Chinolonen. *Chemotherapie Journal* **2. Jahrgang**:24-27.
292. **Schedletzky, H., B. Wiedemann, and P. Heisig.** 1999. The effect of moxifloxacin on its target topoisomerases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43(Suppl B)**:31-37.
293. **Schmid, M. B.** 1990. A locus affecting nucleoid segregation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**:5416-5424.
294. **Schmutz, E., A. Muhlenweg, S. M. Li, and L. Heide.** 2003. Resistance genes of aminocoumarin producers: two type II topoisomerase genes confer resistance against coumermycin A1 and clorobiocin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:869-877.
295. **Schnarr, M., P. Oertel-Buchheit, M. Kazmaier, and M. Granger-Schnarr.** 1991. DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie* **73**:423-431.
296. **Schneeberger, C., P. Speiser, F. Kury, and R. Zeillinger.** 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl.* **4**:234-238.
297. **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.
298. **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.
299. **Schulte, A.** 2001. Stabilität hoher Fluorchinolonresistenz bei Enterobakterien ohne Selektionsdruck. Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
300. **Schulte, A., S. Bagel, B. Wiedeman, and P. Heisig.** 2000. Compensation of the Costs of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli*. Abstract 762 In Program and Abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada.
301. **Schultz, J. E., G. I. Latter, and A. Matin.** 1988. Differential regulation by cyclic AMP of starvation protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:3903-3909.
302. **Selinger, D. W., K. J. Cheung, R. Mei, E. M. Johansson, C. S. Richmond, F. R. Blattner, D. J. Lockhart, and G. M. Church.** 2000. RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *Nat. Biotechnol.* **18**:1262-1268.

303. **Shea, M. E. and H. Hiasa.** 1999. Interactions between DNA helicases and frozen topoisomerase IV-quinolone-DNA ternary complexes. *J. Biol. Chem.* **274**:22747-22754.
304. **Shea, M. E. and H. Hiasa.** 2000. Distinct effects of the UvrD helicase on topoisomerase-quinolone-DNA ternary complexes. *J. Biol. Chem.* **275**:14649-14658.
305. **Sioud, M., O. Possot, C. Elie, L. Sibold, and P. Forterre.** 1988. Coumarin and quinolone action in archaeobacteria: evidence for the presence of a DNA gyrase-like enzyme. *J. Bacteriol.* **170**:946-953.
306. **Slater, S., S. Wold, M. Lu, E. Boye, K. Skarstad, and N. Kleckner.** 1995. *E. coli* SeqA protein binds oriC in two different methyl-modulated reactions appropriate to its roles in DNA replication initiation and origin sequestration. *Cell* **82**:927-936.
307. **Smith C.L.** 1983. recF-dependent induction of *recA* synthesis by coumermycin, a specific inhibitor of the B subunit of DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:2510-2513.
308. **Smith J.T.** 1984. Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials. *Pharm. J.* **233**:299-305.
309. **Smith, D. H. and B. D. Davis.** 1967. Mode of action of novobiocin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **93**:71-79.
310. **Smith, J. T.** 1986. Mechanism of action of quinolones. *Infection* **14(Suppl. 1)**:3-15.
311. **Smith, J. T. and N. T. Ratcliffe.** 1986. Effect of pH value and magnesium on the antibacterial activity of quinolone preparations. *Infection* **14(Suppl. 1)**:31-35.
312. **Snoep, J. L., C. C. Van Der Weijden, H. W. Andersen, H. V. Westerhoff, and P. R. Jensen.** 2002. DNA supercoiling in *Escherichia coli* is under tight and subtle homeostatic control, involving gene-expression and metabolic regulation of both topoisomerase I and DNA gyrase. *Eur. J. Biochem.* **269**:1662-1669.
313. **Somerville, R. L., T. L. Shieh, B. Hagewood, and J. S. Cui.** 1991. Gene expression from multicopy T7 promoter vectors proceeds at single copy rates in the absence of T7 RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**:1056-1062.
314. **Sorensen, M., M. Sehested, and P. B. Jensen.** 1999. Effect of cellular ATP depletion on topoisomerase II poisons. Abrogation Of cleavable-complex formation by etoposide but not by amsacrine. *Mol. Pharmacol.* **55**:424-431.
315. **Stefano, J. E. and J. D. Gralla.** 1982. Spacer mutations in the lac ps promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:1069-1072.
316. **Stone, M. D., Z. Bryant, N. J. Crisona, S. B. Smith, A. Vologodskii, C. Bustamante, and N. R. Cozzarelli.** 2003. Chirality sensing by *Escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:8654-8659.
317. **Strick, T. R., V. Croquette, and D. Bensimon.** 1998. Homologous pairing in stretched supercoiled DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10579-10583.
318. **Strumberg, D., J. L. Nitiss, J. Dong, K. W. Kohn, and Y. Pommier.** 1999. Molecular analysis of yeast and human type II topoisomerases. Enzyme-DNA and drug interactions. *J. Biol. Chem.* **274**:28246-28255.
319. **Strumberg, D., J. L. Nitiss, J. Dong, J. Walker, M. C. Nicklaus, K. W. Kohn, J. G. Heddle, A. Maxwell, S. Seeber, and Y. Pommier.** 2002. Importance of the fourth alpha-helix within the CAP homology domain of type II topoisomerase for DNA cleavage site recognition and quinolone action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2735-2746.
320. **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.
321. **Szybalski, W.** 1952. Microbial selection. I. Gradient plate technique for study of bacterial resistance. *Science* **116**:46-48.
322. **Taddei, F., I. Matic, and M. Radman.** 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11736-11740.

323. **Taki, K. and T. Horiuchi.** 1999. The SOS response is induced by replication fork blockage at a Ter site located on a pUC-derived plasmid: dependence on the distance between ori and Ter sites. *Mol. Gen. Genet.* **262**:302-309.
324. **Thiara, A. S. and E. Cundliffe.** 1988. Cloning and characterization of a DNA gyrase B gene from *Streptomyces sphaeroides* that confers resistance to novobiocin. *EMBO J.* **7**:2255-2259.
325. **Tillett, D., B. P. Burns, and B. A. Neilan.** 2000. Optimized rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping bacterial mRNA transcripts. *Biotechniques* **28**:448-456.
326. **Tran, J. H. and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:5638-5642.
327. **Tse-Dinh, Y. C.** 1985. Regulation of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. *Nucleic Acids Res.* **13**:4751-4763.
328. **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.
329. **Ueguchi, C., M. Kakeda, and T. Mizuno.** 1993. Autoregulatory expression of the *Escherichia coli* hns gene encoding a nucleoid protein: H-NS functions as a repressor of its own transcription. *Mol. Gen. Genet.* **236**:171-178.
330. **Ullmann, A. and A. Danchin.** 1983. Role of cyclic AMP in Bacteria. *Advances in Cyclic Nucleotide Research* **15**:1-53.
331. **Urios, A., G. Herrera, V. Alexandre, and M. Blanco.** 1990. Expression of the recA gene is reduced in *Escherichia coli* topoisomerase I mutants. *Mutat. Res.* **243**:267-272.
332. **Vaara, M. and T. Vaara.** 1983. Polycations Sensitize Enteric Bacteria to Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24**:107-113.
333. **van der Lelie, D., L. Regniers, B. Borremans, A. Provoost, and L. Verschaeve.** 1997. The VITOTOX test, an SOS bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity kinetics. *Mutat. Res.* **389**:279-290.
334. **Van Dyk, T. K., W. R. Majarian, K. B. Konstantinov, R. M. Young, P. S. Dhurjati, and R. A. LaRossa.** 1994. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1414-1420.
335. **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.
336. **Voigt, W. H. and H. J. Zeiler.** 1985. Influence of ciprofloxacin on the ultrastructure of gram-negative and gram-positive bacteria. *Arzneimittelforschung.* **35** :1600-1603.
337. **Walker, G. C.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**:60-93.
338. **Walker, G. C.** 1996. The SOS response of *Escherichia coli*, p. 1400-1416. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington D.C.
339. **Walters, R. N., L. J. Piddock, and R. Wise.** 1989. The effect of mutations in the SOS response on the kinetics of quinolone killing. *J. Antimicrob. Chemother.* **24** :863-873.
340. **Wang, H., J. L. Dzink-Fox, M. Chen, and S. B. Levy.** 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1515-1521.
341. **Wang, J. C.** 1985. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:665-697.
342. **Wang, J. C.** 1991. DNA topoisomerases: why so many? *J. Biol. Chem.* **266**:6659-6662.
343. **Wang, J. C.** 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:635-692.
344. **Wang, J. C., P. R. Caron, and R. A. Kim.** 1990. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? *Cell* **62**:403-406.

345. **Wang, J. Y. and M. Syvanen.** 1992. DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol. Microbiol.* **6**:1861-1866.
346. **Wang, L. and J. Lutkenhaus .** 1998. FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol. Microbiol.* **29**:731-740.
347. **Ward, D. and A. Newton.** 1999. Cell Cycle Expression and Transcriptional Regulation of DNA Topoisomerase IV Genes in *Caulobacter*. *J. Bacteriol.* **181**:3321-3329.
348. **Weber, M. H. and M. A. Marahiel.** 2003. Bacterial cold shock responses. *Sci. Prog.* **86**:9-75.
349. **Wei, Y., A. C. Vollmer, and R. A. LaRossa.** 2001. In vivo titration of mitomycin C action by four *Escherichia coli* genomic regions on multicopy plasmids. *J. Bacteriol.* **183**:2259-2264.
350. **White, J. H.** 1969. Self-linking and the Gauss integral in higher dimensions. *Amer. J. Math.* **91**:693-729.
351. **Wickens, H. J. and R. J. Pinney.** 2001. Investigation of Smith's quinolone killing mechanisms during the PAE of ciprofloxacin on *Escherichia coli*. *Int. J. Pharm.* **227**:149-156.
352. **Wickens, H. J., R. J. Pinney, D. J. Mason, and V. A. Gant.** 2000. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:682-687.
353. **Wilfinger, W. W., K. Mackey, and P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**:474-481.
354. **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.
355. **Woessner, R. D., M. R. Mattern, C. K. Mirabelli, R. K. Johnson, and F. H. Drake.** 1991. Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ.* **2**:209-214.
356. **Worcel, A. and E. Burgi.** 1972. On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **71**:127-147.
357. **Wu, H. M. and D. M. Crothers .** 1984. The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature* **308**:509-513.
358. **Yang, S., S. R. Clayton, and E. L. Zechiedrich.** 2003. Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:545-556.
359. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
360. **Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka, and S. Nakamura .** 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1647-1650.
361. **Yoshida, H., T. Kojima, J. Yamagishi, and S. Nakamura.** 1988. Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **211**:1-7.
362. **Yoshida, H., M. Nakamura, M. Bogaki, H. Ito, T. Kojima, H. Hattori, and S. Nakamura.** 1993. Mechanism of action of quinolones against *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:839-845.
363. **Ysern, P., B. Clerch, M. Castano, I. Gibert, J. Barbe, and M. Llagostera.** 1990. Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis* **5**:63-66.
364. **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.
365. **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.

366. **Zechiedrich, E. L., A. B. Khodursky, and N. R. Cozzarelli.** 1997. Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**:2580-2592.
367. **Zeiler, H. J. and K. Grohe.** 1984. The in vitro and in vivo activity of ciprofloxacin. *Eur.J.Clin.Microbiol.* **3**:339-343.
368. **Zhao, S., Q. Zhu, and R. L. Somerville.** 2000. The sigma(70) transcription factor TyrR has zinc-stimulated phosphatase activity that is inhibited by ATP and tyrosine. *J.Bacteriol.* **182**:1053-1061.
369. **Zhu, Q., P. Pongpech, and R. J. DiGate.** 2001. Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9766-9771.

7 Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>agaY</i>	Gen der Tagatose-1,6-Bisphosphat Aldolase
aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cip	Ciprofloxacin
Clm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CRP	cAMP receptor protein
C _T -Wert	Schwellenwert-Zyklus der real-time PCR
Δ	Deletion
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	Et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
FIS	factor for inversion stimulation
GSP	genspezifische Primer
<i>gyrA</i>	Gen der Untereinheit A der Gyrase
<i>gyrB</i>	Gen der Untereinheit B der Gyrase
h	Stunde
H-NS	histone-like nucleoid structuring protein
IHF	integration host factor
kb	Kilobasenpaar(e)
KBE	koloniebildende Einheiten
L	Liter
Lk	Verknüpfungszahl der DNA
mM	Millimolar (Millimol/L)
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
MMS	Methyl-Methansulfonat
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
ms	Millisekunde
n	Anzahl der Untersuchungen
NaAc	Natriumacetat

n.b.	nicht bestimmt
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nonomolar (Nanomol/L)
nt	Nukleotide
Nor	Norfloxacin
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
<i>parC</i>	Gen der A-Untereinheit der Topoisomerase IV
<i>parE</i>	Gen der B-Untereinheit der Topoisomerase IV
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMBN	Polymyxin B Nonapeptid
pmol	Pico-Mol
QRDR	quinolone resistance determining region
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
S(x)	geschätzte Standardabweichung
<i>srmB</i>	Gen der ATP-abhängigen RNA-Helicase
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
<i>topA</i>	Gen der Topoisomerase I
Topo	Topoisomerase
ts	Temperatur sensitiv
Tw	DNA-Twist
U	Unit
u. a.	unter anderen
ÜN	Übernacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
Wr	Biegung der DNA-Helixachse
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (Mikro-Mol/L)
z. B.	zum Beispiel

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Heisig. Er ermöglichte mir das Erstellen dieser Arbeit in seiner Abteilung, die durch eine motivierende, sympathische und hilfsbereite Atmosphäre geprägt war. Ich bedanke mich für die Betreuung der Dissertation, seine Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft sowie für sein Engagement, mir die Teilnahme an zahlreichen Kongressen und Workshops und eine abschließende Finanzierung zu ermöglichen.

Herrn Prof. Dr. Bernd Wiedemann danke ich für seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft und sein Engagement, mir ebenfalls die Teilnahme an zahlreichen Kongressen und Workshops zu ermöglichen.

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

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern des Arbeitskreises Wiedemann und des Arbeitskreises Heisig für die hilfsbereite und teilweise sehr freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie für viele lustige Stunden im und außerhalb vom Labor.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Nadja Auer, Mobarak Abu Mraheil und Marcus Hogh, die durch Ihre stete Diskussionsbereitschaft und viele sehr wertvolle Anregungen, die Arbeit vorwärts gebracht haben.

Bei Marcus Hogh möchte ich mich ausdrücklich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Frau Bedia Bugdaci für die Bereitstellung von Nährmedien und Glasgeräten während meiner Zeit in Bonn sowie Barbara Körber und Tatjana Claussen für die Synthese von Oligonukleotiden.

Ansgar Schulte und Antje Schnasse möchte ich für Sequenzierungen sowie für die Einarbeitung und Hilfestellungen am Sequenzer danken.

Naja Auer und Martina Grüger danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ich danke auch meinen Finanzgebern:

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Freien und Hansestadt Hamburg

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen meinen Freunden, die mir gezeigt haben, dass es ausser der Forschung noch andere Dinge im Leben gibt.

Ein besonderes Dankeschön gilt schließlich meinen Eltern, meinen Geschwistern sowie meiner lieben Tina für ihre Geduld, den steten Zuspruch und die emotionale Unterstützung, die mir während des Studiums und der Promotion sehr geholfen haben.

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.

Bonn, den 31.07.2004

Thomas Grüger

Lebenslauf

Name: Thomas Grüger
geboren: 13.02.1972 in Düsseldorf

Schulbildung:

1979 - 1983 Gemeinschafts-Grundschule Düsseldorf/Angermund
1983 - 1989 Werner-von-Siemens Realschule Düsseldorf
1989 - 1991 Theodor-Fliedner-Gymnasium Düsseldorf mit Abitur abgeschlossen

Zivildienst:

10/1997 - 10/1998 im Ökozentrum Bonn e.V.

Akademischer Werdegang:

1991 - 1993 Grundstudium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/1993 Vordiplom in Biologie
10/1993 – 04/1997 Hauptstudium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
04/1997 Diplomprüfung
05/1997 – 09/1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität Bonn
11/1998 Beginn der Promotion an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig
06/2001 Wechsel mit der Arbeitsgruppe an die Universität Hamburg
09/1999 – 09/2001 Wissenschaftlicher Angestellter im Rahmen einer DFG-Förderung
10/2001 – 09/2002 Stipendiat der Landesgraduiertenförderung Hamburg
seit 04/2004 Wissenschaftlicher Angestellter am Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn

Veröffentlichungen:

Stock I, Grüger T, Wiedemann B. (2000) Natural antibiotic susceptibility of *Rahnella aquatilis* and *R. aquatilis*-related strains. J. Chemother. 12, 30-9

Stock I, Grüger T, Wiedemann B. (2001) Natural antibiotic susceptibility of strains of the *Enterobacter cloacae* complex. Int. J. Antimicrob. Agents 18, 537-45

Stock I, Burak S, Sherwood K J, Grüger T, and Wiedemann B. (2003) Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odororifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidea*; J. Antimicrob. Chemother. 51, 865-885

Stock I, Grüger T, Wiedemann B. (2003) Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens* sensu stricto, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. Int. J. Antimicrob. Agents 22, 35-47

Grüger T, Nitiss J L, Maxwell A, Zechiedrich E L, Heisig P, Seeber S, Pommier Y, and Dirk Strumberg. (2004) A mutation in *E. coli* DNA gyrase conferring quinolone resistance results in sensitivity to drugs targeting eukaryotic topoisomerase II. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 4495-504