

Zusammenfassung

In Bakterien katalysiert Topoisomerase IV (Topo IV) die Trennung von Tochterchromosomen nach der Replikation und unterstützt durch die Relaxierung von positiv überspiralierter DNA die Replikation und Rekombination. Topo IV und die strukturell ähnliche Topoisomerase II (Gyrase) sind die Zielstrukturen für die klinisch bedeutsamen Fluorchinolone-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 chinolonresistente 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.